

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biitekniikka

2014

Anna Kauppinen

KAKSIFAASIUUTTO TEOLLI- SESTI MERKITTÄVIEN PROTE- IINIEN ERISTÄMISESSÄ

– Hydrofobiiniavusteinen erotusmenetelmä



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Anna Kauppinen

KAKSIFAASIUUTTO TEOLLISESTI MERKITTÄVIEN PROTEIINIEN ERISTÄMISESSÄ

Entsyymiavusteisten teollisten prosessien lisääntyessä yksinkertaisille ja edullisille proteiinien suuren mittakaavan tuotto- ja erotusmenetelmille on kysyntää. Entsyymejä käytetään yleensä lääke- ja elintarviketeollisuudessa alentamaan reaktioiden aktivaatioenergioita.

Hydrofobiiniavusteinen kaksifaasierotus on uusi menetelmä, joka hyödyntää kalvoproteiini hydrofobiinin hydrofobisia ominaisuuksia. Rekombinattitekniikalla voidaan haluttu kohdeproteiini liittää kalvoproteiini hydrofobiiniin ja tuottaa syntynyttä fuusioproteiinia edullisessa hiivatuotosysteemissä. Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia hydrofobiiniavusteiseen vesipohjaiseen kaksifaasierotusmenetelmään vaikuttavia tekijöitä.

Jotta hydrofobiiniavusteinen kaksifaasierotus olisi teollisen mittakaavan prosessina kannattava, tulisi menetelmän ennen kaikkea olla toistettava. Saannon tulee olla kannattavalla tasolla ja uuton tilavuuden tulisi pienentyä mahdollisimman paljon, jotta tilavuuden jatkokäsittely on helppoa ja edullista.

Opinnäytetyössä suoritettujen kokeiden perusteella hydrofobiiniavusteinen erotusmenetelmä on mahdollinen vaihtoehto suuren mittakaavan tuotannossa ja erotuksessa. Sopivalla puskurikon-sentraatiolla ja suolan lisäyksellä saadaan toistettava uutto, jonka saanto on teollisessa mitta-kaavassa hyvä. Puskuroinnilla ja suolojen lisäyksellä voidaan vaikuttaa myös halutun faasin konsentroitumiseen. Menetelmän etuja lisää yksinkertainen laitteisto, työvaiheiden vähyyys ja prosessin nopeus.

Tällä hetkellä kuitenkin proteiinirikkaan faasin koon kasvu verrattuna lähtönäytteeseen tuottaa ongelmia tilavuuksien kasvaessa tehdastuotannon tasolle. Erotusastioilta vaadittaisiin valtavaa kapasiteettia ja suurten tilavuuksien käsittely voi tulla hankalaksi ja kalliiksi. Lisää kokeita menetelmän optimoimiseksi laboratoriomittakaavassa ja mahdollisuudesta pienentää haluttua lopputi-lavuutta on tehtävä ennen suurempaan mittakaavaan siirtymistä.

ASIASANAT:

kaksifaasierotusmenetelmä, hydrofobiini, fuusioproteiini, entsyymi, glukoosioksidaasi, puhdistus

Anna Kauppinen

TWO-PHASE EXTRACTION IN SEPARATION OF INDUSTRIALLY SIGNIFICANT PROTEINS

Novel applications of enzyme catalyzed industrial processes have raised a demand for simple and profitable methods for large-scale protein production and purification. Enzymes are widely exploited in the pharmaceutical and food industry to lower activation energies in reactions.

Hydrophobin-based two-phase extraction is a novel method exploiting the hydrophobic features of the membrane protein. Recombinant gene technology allows the attachment of the desired target protein onto hydrophobin and the production of the recombinant protein in a cost-effective yeast production system. The aim of the thesis was to study the different factors affecting the hydrophobin-based extraction.

In order to make hydrophobin-based extraction viable on industrial scale, the method should be replicable. The yield should be on a profitable level and the volumes handled during the process should be concentrated and decreased to facilitate further processing.

The experiments carried out for the thesis show that the studied method has potential to provide an alternative for existing methods for protein production and purification on the industrial scale. A replicable extraction method with profitable yield on industrial scale can be created with a suitable buffer concentration and addition of salt. Also the concentration of the phases can be modified with buffering and salt addition. Simple equipment, few stages of operation and speed add to the advantages of the method.

However the increase in the volume of the final phase compared to the initial volume causes problems when considering scale-up. The separation tanks should be very large and the handling of such volumes may prove both difficult and expensive. More studies for the optimization and possibilities of the method should be carried out on laboratory scale before scale-up to industrial level.

KEYWORDS:

phase separation, hydrophobin, fusion protein, enzyme, glucose oxidase, purification

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	7
1 JOHDANTO	7
2 PROTEIINIT	8
2.1 Entsyymit	8
2.1.1 Glukoosioksidaasi	9
2.2 Hydrofobiinit	10
2.2.1 <i>Trichoderma reesei</i> –sienen HFBI	11
2.3 Fuusioproteiinit	11
2.3.1 Fuusioproteiinin tuotto <i>Pichia pastoris</i> –hiivassa	12
3 VESIPOHJAINEN KAKSIFAASIEROTUSMENETELMÄ PROTEIINIEN ERISTÄMISESSÄ	14
3.1 Detergentit	15
3.1.1 Triton X-114	16
3.1.2 Berol 266	16
3.2 Hydrofobiinin käyttö kaksifaasierotusmenetelmässä	17
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	19
4.1 Hiivasolujen hajotus	19
4.2 Hydrofobiiniavusteinen kaksifaasierotusmenetelmä	19
4.2.1 Puskurikonsentraation optimointi	20
4.2.2 Eri suolojen ja niiden konsentraation vaikutus	21
4.3 Glukoosioksidaasin entsyymiaktiivisuusmittaus	21
4.4 SDS-PAGE	22
4.5 Western Blotting	23
4.6 Proteiinin määritys BCA-menetelmällä	24
4.7 Isobutanolin vaikutus entsyymiaktiivisuuteen	24
5 TULOKSET JA TULOSTEN ANALYYSINTI	26
5.1 Puskurivahvuuden optimointi	26
5.1.1 Western Blotting puskurioptimoinnin näytteillä	28

5.2	Natriumkloridin ja sen konsentraation vaikutus	30
5.3	Ammoniumkloridin ja sen konsentraation vaikutus	32
5.4	Kaliumkloridin ja sen konsentraation vaikutus	34
5.5	Isobutanolin vaikutus entsyymiaktiivisuuteen	35
5.6	Yhteenveto	37
6	JOHTOPÄÄTÖKSET	38
	LÄHTEET	40

LIITTEET

Liite 1. Käytetyt reagenssit
 Liite 2. Puhdistustaulukot

KUVAT

Kuva 1.	Peptidisidoksen muodostuminen. (Fessenden & Fessenden, 1998)	8
Kuva 2.	Glukoosioksideasin rakenne <i>Aspergillus niger</i> –homeessa. (Wohlfahrt, et al., 1999)	10
Kuva 3.	Tuottovektorin yksinkertaistettu rakenne.	12
Kuva 4.	Esimerkkikuva faasiutumisesta.	15
Kuva 5.	Misellin rakenne kaksikulotteisesti esitettynä (Gusev, et al., 2011).	16
Kuva 6.	Hydrofobiiniavusteisen erotusmenetelmän kaaviokuva, jossa on kuvattuna detergenttifaasin muodostuminen sekä vesipohjaisen faasin ylä- että alapuolelle. Detergenttifaasin paikka määräytyy sen ominaisuuksien perusteella.	18
Kuva 7.	Triton-uuton puskuroptimoinnin näytteillä tehty Western Blotting, jossa 1) markkeri, 2) lähtönäyte, 3) 10 mM puskuroitu 1. uuton yläfaasi, 4) 10 mM puskuroitu 2. uuton alafaasi, 5) 40 mM puskuroitu 1. uuton yläfaasi, 6) 40 mM puskuroitu 2. uuton alafaasi, 7) markkeri, 8) positiivinen kontrolli.	28
Kuva 8.	Berol-uuton puskuroptimoinnin näytteillä tehty Western Blotting, jossa 1) markkeri, 2) lähtönäyte, 3) 10 mM puskuroitu 1. uuton alafaasi, 4) 10 mM puskuroitu 2. uuton alafaasi, 5) 40 mM puskuroitu 1. uuton alafaasi, 6) 40 mM puskuroitu 2. uuton alafaasi, 7) markkeri, 8) positiivinen kontrolli.	30

KUVIOT

Kuvio 1.	Puskurikonsentraation vaikutus Triton-uuton saantoon ja faasien kokoon.	26
Kuvio 2.	Puskurikonsentraation vaikutus Berol-uuton saantoon ja faasien kokoon.	27
Kuvio 3.	Natriumkloridipitoisuuden vaikutus Triton-uuton saantoon ja faasien kokoon.	31
Kuvio 4.	Natriumkloridin vaikutus Berol-uuttoon.	32
Kuvio 5.	Ammoniumkloridin vaikutus Triton-uuttoon.	33

Kuvio 6. Ammoniumkloridin vaikutus Berol-uuttoon.	33
Kuvio 7. Kaliumkloridin vaikutus Triton-uuttoon.	34
Kuvio 8. Kaliumkloridin vaikutus Berol-uuttoon.	35
Kuvio 9. Isobutanolin vaikutus entsyymiaktiivisuuteen.	36
Kuvio 10. Isobutanolipitoisuuden ja entsyymiaktiivisuuden välinen korrelaatio.	37

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

ATBS	2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonate) Glukoosioksidaasin entsyymiaktiivisuusmäärityksessä käytetty väriä muodostava substraatti. (Bankar, et al., 2009)
BCA	Bicinchoninic acid, bikinkoniinihappo
BSA	Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini
DTT	Ditiotreitoli
FADH ₂	Flaviiniadeniinidinukleotidin pelkistynyt muoto, elektroninsiirtäjämolekyyli
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi

1 JOHDANTO

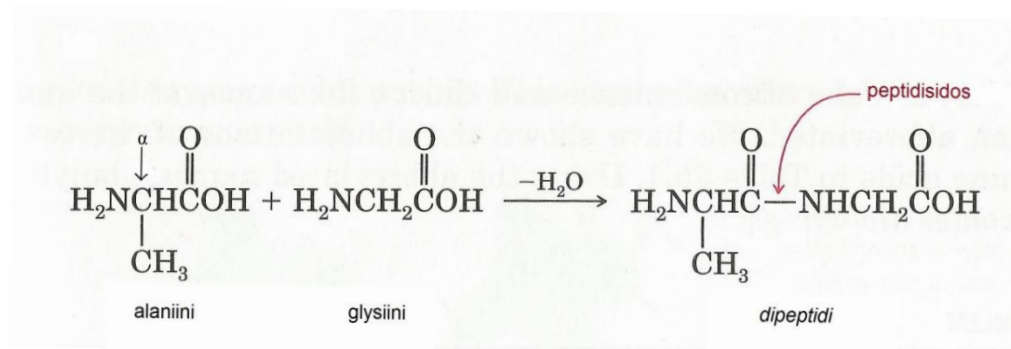
Entsyymien, kuten glukoosioksidaasin, kaupallinen arvo ja kysyntä on jatkuvassa kasvussa niille löytyessä yhä uusia käyttösovelluksia (Bankar, et al., 2009). Proteiinien tuotto- ja puhdistusmenetelmät ovat kuitenkin usein kalliita ja hankalia. Kustannukset kasvavat viimeistään nostettaessa mittakaava teolliselle tasolle. Monet yleisessä käytössä olevat menetelmät, kuten geeli- tai kalvosuodatus eivät edes hyvin sovellu käytettäväksi suuressa mittakaavassa proteiinien puhdistukseen. Kysyntää yksinkertaiselle, toistettavalle ja edulliselle proteiinien puhdistusmenetelmälle on.

Vesipohjainen kaksifaasierotus on hellävarainen ja melko yksinkertainen menetelmä biologisten molekyylien erottelemiseksi. Menetelmää käytettäessä puhdistuksessa ei yleensä tapahdu denaturaatiota tai entsyymiaktiivisuuden menetyksiä. (Asenjo & Andrews, 2012) Kaksifaasierotus soveltuu erityisesti kalvoproteiinien erotukseen niiden hydrofobisten ominaisuuksien vuoksi, mitkä erottavat ne useista muista proteiineista. Nykyaikainen geeniteknologia mahdollistaa fuusioproteiinien luomisen, jolloin kalvoproteiinien erikoisia ominaisuuksia voidaan hyödyntää halutun kohdeproteiinin erottamisessa.

Opinnäytetyön tavoitteena on tutkia hydrofobiiniavusteiseen vesipohjaiseen kaksifaasierotukseen vaikuttavia parametreja. Opinnäytetyö tehtiin osana Turun ammattikorkeakoulun ja Teknologian Tutkimuskeskus VTT:n yhteistä Hydrobody-projektia. Hydrobody-projekti on Tekesin rahoittama tutkimusprojekti, jonka tavoitteena on kehittää uudenlainen proteiinien tuotto- ja puhdistusmenetelmä.

2 PROTEIINIT

Proteiinit ovat aminohappojen dehydratoituneita polymeereja, joissa aminohapot ovat liittyneet toisiinsa erityisellä kovalenttisella sidoksella, jota kutsutaan peptidisidokseksi. Aminohapoissa α -hiileen (kuva 1) on liittynyt karboksyyli- ja aminoryhmän lisäksi sivuketju, joka on jokaiselle aminohapolle ominainen ja vaihtelee niin rakenteensa, kokonsa, varauksensa kuin hydrofobisuutensa tai hydrofiilisyytensä puolesta. Peptidisidos muodostuu yhden aminohapon karboksyyli- ja toisen aminohapon aminoryhmän välille ja reaktiossa vapautuu vettä. Kaikki aminohapot ovat L-stereoisomeerejä. (Nelson & Cox, 2000)



Kuva 1. Peptidisidoksen muodostuminen. (Fessenden & Fessenden, 1998)

Proteiinien rakennetta voidaan tarkastella neljällä eri tasolla. Primäärirakenteella tarkoitetaan aminohapposekvenssiä. Sekundäärirakenteisiin luetaan α -heliksi, β -laskos, kolmoiskierre, satunnainen silmukka tai käännös. Sekundääri-rakenne voidaan ennustaa kohtuullisen hyvin aminohapposekvenssin perusteella. Tertiäärirakenteeseen kuuluvat ketjujen väliset sidokset, kuten vety- tai disulfidididokset. Kvartenäärinen rakenne muodostuu ketjujen keskinäisestä rakenteesta ja asemasta toisiinsa nähden. Ketjujen keskinäinen asema voidaan joskus ennustaa sekundäärirakenteesta hydrofobiaan perustuvien sääntöjen avulla. (Laatikainen, 2002)

2.1 Entsyymit

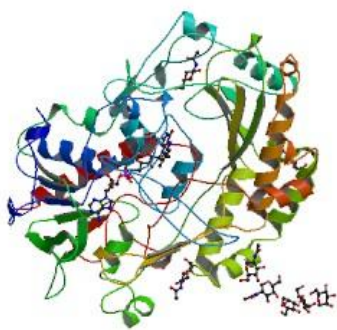
Entsyymien tehtävä on katalysoida elämää ylläpitäviä kemiallisia reaktioita, jotka muuten tapahtuisivat riittämättömällä nopeudella. Entsyymit kasvattavat re-

aktionopeusvakiota (k) tekijällä $10^4 - 10^9$. Melkein kaikki entsyymit ovat erikoistuneita proteiineja. Poikkeuksen tekevät vain pieni joukko katalyyttisiä RNA-molekyylejä. Entsyymien katalyyttinen aktiivisuus on riippuvainen proteiinien konformaation eheydestä. Entsyymillä voi olla yksi tai useampia aktiivisia kohtia. Jos proteiini denaturoituu tai pilkkoutuu osiin, katalyyttinen aktiivisuus usein menetetään. Jotkin entsyymit ovat aktiivisia itsessään, mutta toiset tarvitsevat kofaktoriksi joko yhden tai useamman epäorgaanisen ionin tai koentsyymiksi orgaanisen tai metalliyhdiste-molekyylin. Kofaktori, koentsyymi tai molemmat yhdessä sitoutuvat entsyymiin aktivoiden sen. (Nelson & Cox, 2000), (Laatikainen, 2002)

Entsyymit luokitellaan niiden katalysoimien reaktioiden perusteella. Entsyymien katalysoiva vaikutus perustuu aktivaatioenergian alenemiseen. Entsyymit eivät vaikuta reaktiotasapainoon, ainoastaan reaktionopeus kasvaa. Entsyymin katalysoima reaktio tapahtuu entsyymin nk. aktiivisessa kohdassa. Aktiiviseen kohtaan sitoutuvaa molekyyliä kutsutaan substraatiksi. Entsyymi-substraatti -kompleksi muuttuu entsyymi-tuote -kompleksiksi ja tuote irtaantuu entsyymistä. Entsyymi ei siis reagoi tai kulu prosessissa. (Nelson & Cox, 2000)

2.1.1 Glukoosioksidaasi

Glukoosioksidaasi (GOX) on flavoproteiini, joka katalysoi β -D-glukoosin hapettumista glukonihapoksi. Reaktio voidaan jakaa pelkistymis- ja hapettumisosareaktioihin ja sen sivutuotteena muodostuu vetyperoksidia. Pelkistymisosareaktiossa GOX katalysoi β -D-glukoosin hapettumista D-glukoni- δ -laktoniksi, joka ei entsyymaattisesti hydrolysoituu glukonihapoksi. Samalla GOX:n flaviiniadeniini-dinukleotidirengas (FAD) pelkistyy FADH_2 :ksi. Hapettumisosareaktiossa pelkistynyt GOX hapettuu uudelleen ja syntyy vetyperoksidia ja vettä. *Aspergillus niger* -homeen GOX:n molekyylipaino on SDS-PAGE:lla määritettynä 75 – 80 kDa (kilodaltonia) (Frederick, et al., 1990). Luonnossa *A. niger*:n GOX esiintyy dimeereinä, joiden molekyylipaino on noin 160 kDa. (Bankar, et al., 2009)



Kuva 2. Glukoosioksidaasin rakenne *Aspergillus niger* –homeessa. (Wohlfahrt, et al., 1999)

Glukoosioksidaasia käytetään useilla eri teollisuuden aloilla, kuten lääke-, elintarvike- ja kemianteollisuudessa. GOX on yleisin glukoosin määrittämiseen käytetty analyttinen reagenssi edullisen hintansa ja hyvän stabilisuutensa vuoksi. (Bankar, et al., 2009)

Lääketeollisuudessa GOX:n tärkein sovellus on diabetekseen liittyvässä veren sokeripitoisuuden mittamisessa. Energiateollisuudessa entsymaattisesti toimivat biopolttoainekennnot voivat käyttää GOX:a kemiallisen energian muuntamisessa sähköenergiaksi. Elintarviketeollisuudessa GOX:a käytetään tuotteiden sokeri- ja happipitoisuuden alentamiseen, mikä parantaa tuotteiden säilyvyyttä. GOX estää mm. säilykkeiden ja pullotettujen juomien väri- ja makumuutoksia poistamalla hapen suljetun pakkauksen sisältä. Hammashygieniasa GOX:a käytetään sen tuottaman vetyperoksidin vuoksi. Vetyperoksidi on tehokas bakteriosidi, eli bakteereja tappava aine. Vetyperoksidia käytetään myös tekstiiliteollisuudessa kankaiden valkaisuun. GOX:a voidaan käyttää myös glukonihapposynteesin katalyyttinä. Glukonihappoa käytetään mm. happamuudensäätöaineena, valkaisuaineena elintarviketeollisuudessa ja suolana lääketeollisuudessa. Glukonihappoa on käytetty jopa sementin lisäaineena parantamaan lujuutta äärimmäisissä sääoloissa. (Bankar, et al., 2009)

2.2 Hydrofobiinit

Hydrofobiinit ovat pieniä hydrofobisia sienten tuottamia kalvoja muodostavia proteiineja, joiden molekyylimassa on noin 10 kDa (Khalesi, et al., 2012). Hyd-

rofobiineilla on kyky muuntaa hydrofobiset pinnat hydrofiilisiksi ja päinvastoin järjestäytymällä amfipaattiseksi proteiinikalvoksi. Ne ovat myös pinta-aktiivisimpien tunnettujen molekyylien joukossa. Ominaisuuksiensa vuoksi hydrofobiineilla on monia mahdollisia käyttösovelluksia, kuten solujen tai proteiinien kiinnittäminen pintoihin, hydrofobisuuden muuttaminen bioyhteensopivuuden lisäämiseksi kudosteknologiassa tai öljyn dispergointi teollisuudessa. (Askolin, et al., 2001)

Hydrofobiinit jaetaan kahteen luokkaan hydropaattisten rakenteidensa ja näiden proteiinimuodostelmien liukoisuuden perusteella. Luokan 1 hydrofobiinit muodostavat kestäviä rakenteita, jotka liukenevat mm. sellaisiin reagensseihin kuin trifluorietikka- tai muurahaishappo. Luokan 2 hydrofobiinit liukenevat esimerkiksi 60-prosenttiseen etanoliin tai 2-prosenttiseen natriumdodekyylisulfaattiin. (Askolin, et al., 2001)

2.2.1 *Trichoderma reesei* –sienen HFBI

Trichoderma reesei on monisoluisena rihmastona kasvava sieni eli home. Viljeltäessä sieni on erittäin nopeakasvuinen ja siksi laajasti käytetty proteiinien tuotosta teollisuudessa. *T. reesei*:n HFBI-proteiini kuuluu luokan 2 hydrofobiineihin ja sen molekyylimassa on 7,533 kDa. HFBI sisältää erityisen paljon aminohappo kysteiiniä. Proteiinilla on tärkeä rooli sienirihmaston kehityksessä, ja se vaikuttaa myös itiöiden muodostuksessa (Askolin, et al., 2005). (Askolin, et al., 2001), (Seiboth, et al., 2011)

2.3 Fuusioproteiinit

Fuusioproteiinit muodostuvat kahdesta proteiinista tai proteiinista ja polypeptidistä, joista toinen on fuusio-osa. Fuusioproteiineja käytetään tuotettaessa proteiineja. (Terpe, 2003)

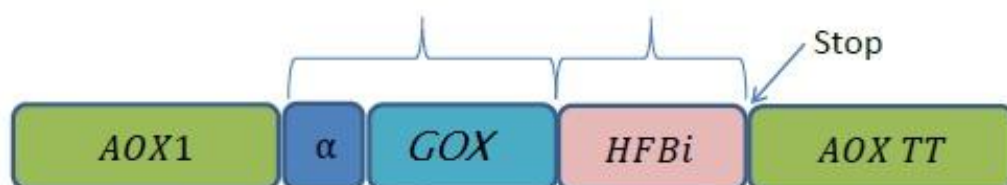
Yleisimpiä fuusio-osia ovat MBD (Maltose binding protein, maltoosia sitova proteiini), polyHis (histidiini), GST (Glutathione S-transferase, glutationi-S-transferaasi) ja hydrofobiini. Fuusio-osa voi olla kiinnittynyt proteiiniin joko N- tai C-terminaaliin (amino tai karboksyyli). Proteiinien puhdistuksessa fuusio-osa

sitoutuu spesifisesti tai ei-spesifisesti. Fuusio-osan ja varsinaisen proteiinin välissä on liitososa (nk. linkkeri), joka yleensä sisältää proteaasin spesifisen tunnistuskohdan. Fuusio-osa voi vaikuttaa haitallisesti tuotetun proteiinin laskostumiseen. Fuusioproteiineja voidaan käyttää joko sellaisenaan tai irrottamalla fuusio-osa esimerkiksi proteaasin avulla. Fuusioproteiineja voidaan tuottaa bakteeri-, hiiva-, kasvi-, hyönteis- ja nisäkässoluissa. Tuottaessa fuusioproteiinit voivat jäädä solujen sisään tai erittyä solun ulkopuolelle. (Terpe, 2003)

2.3.1 Fuusioproteiinin tuotto *Pichia pastoris* -hiivassa

Opinnäytetyön näytteenä käytetään *Pichia pastoris* -hiivan X-33 -kannassa tuotettua fuusioproteiinia, joka on *Aspergillus nigeris* -homeen glukooksioksidaasin ja *Trichoderma reesei* -sienen HFBI-proteiinin muodostama fuusioproteiini. Hiivakanta on transformoitu pPICZ α -geenivektorilla (kuva 3).

Metylotrooppinen hiiva *P. pastoris* on todettu hyväksi tuottoisännäksi sekä solun sisäisille että solun ulkopuolelle erittyville proteiineille. Sen teho perustuu voimakkaaseen ja helposti kontrolloitavaan alkoholioksidaasipromootoriin. Alkoholioksidaasi on entsyymi, joka katalysoi metanoliaineenvaihdunnan ensimmäistä vaihetta. Proteiinin tuottoa *P. pastoris* -hiivassa indusoidaan lisäämällä metanolia. *P. pastoris* -hiivan suurimpia etuja edullisiin ja yksinkertaisiin bakteerituottosysteemeihin verrattuna on sen kyky muokata proteiineja translaation jälkeen. Muita etuja ovat tehokas eritys, kyky kasvaa korkeissa solutiheyksissä ja melko suolattomissa oloissa, mikä tekee suuren mittakaavan tuotannosta edullista. (Crognale, et al., 2006)



Kuva 3. Tuottovektorin yksinkertaistettu rakenne.

Glukoosioksidaasia ja hydrofobiinia koodaavien sekvenssien välissä on TEV-proteaasin (Tobacco Etch virus) tunnistussekvenssi, jonka avulla hydrofobiini on helposti irroitettavissa kohdeproteiinista.

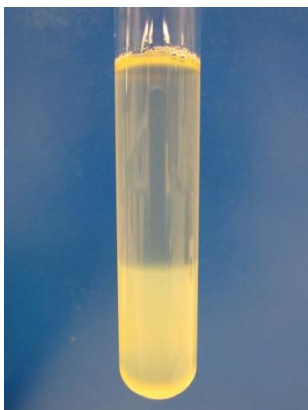
3 VESIPOHJAINEN KAKSIFAASIEROTUSMENETELMÄ PROTEIINIEN ERISTÄMISESSÄ

Kaksifaasierotusta käytetään erottamaan proteiineja muista proteiineista tai solun osista. Vesipohjainen kaksifaasierotus pohjautuu kahden polymeerin vesiliuoksen tai polymeerin ja suolan vesiliuoksen yhteensopimattomuuteen korkeassa ionikonsentraatiossa. Polymeerit muodostavat aggregaatteja ja lopulta faasiutuvat (kuva 4). Polymeerin ja suolan vesiliuoksessa polymeeri muodostaa aggregaatteja ja suola sitoo suurimman osan vedestä. Faasiutuminen ei ole koskaan täydellistä, vaan kaikkia liuoksen komponentteja löytyy kummastakin faasista. Proteiinit ovat vuorovaikutuksessa ympäröivien molekyylien kanssa vety- ja ionisidosten sekä hydrofobisten ja muiden heikkojen vuorovaikutusten kautta. Näiden vuorovaikutusten yhteenlaskettu vaikutus on erilainen eri faaseissa, minkä seurauksena proteiinit kulkeutuvat suurimmaksi osaksi tiettyyn faasiin. Seuraavia ominaisuuksia yhdessä tai erikseen voidaan hyödyntää proteiinien erottamisessa vesipohjaisella kaksifaasimenetelmällä:

- Hydrofobisuuden tai hydrofiilisyyden avulla proteiinit voidaan erottaa detergenttipohjaiseen ja vesipohjaiseen faasiin.
- Faasien elektrokemiallisten ominaisuuksien eroavaisuuksien perusteella molekyylit voidaan erottaa varaustensa mukaisesti.
- Molekyylit voidaan erotella kokonsa mukaan.
- Biospesifiseen affiniteettiin perustuva erotusmenetelmä hyödyntää proteiinin ja faasin polymeerin välistä affiniteettia.
- Proteiinit voidaan erotella konformaationsa perusteella.

Tällöin tekijät, jotka vaikuttavat proteiinien erottumiseen vesipohjaisessa kaksifaasisysteemissä, ovat:

- polymeerien molekyylipaino tai koko
- polymeerin konsentraatio
- liuoksen ionipitoisuus
- pH

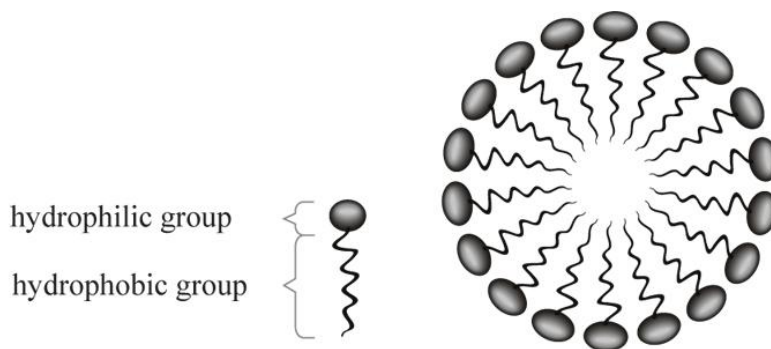


Kuva 4. Esimerkkikuva faasiutumisesta.

Liuoksen ionivahvuuteen vaikuttaa suolapitoisuus, jonka lisäys parantaa hydrofobista erotuskykyä. Jokaisella proteiinilla on yksilöllinen pI (isoelektrinen piste). Isoelektrinen piste on pH -arvo, jossa proteiinilla ei ole ulkoista varausta. Tällöin proteiinin liukoisuus on alhaisimmillaan. Tätä voidaan hyödyntää proteiinien erottamisessa ottamalla se huomioon liuosten pH -arvoissa. (Asenjo & Andrews, 2011)

3.1 Detergentit

Detergentit, jotka ovat pinta-aktiivisia aineita, ovat amfipaattisia molekyylejä, jotka yleensä koostuvat polaarista tai varautuneesta pääryhmästä ja pitkästä hydrofobisesta hiilivetyketjusta. Hyvin pieninä pitoisuuksina detergenttimolekyylit ovat liukoisina monomeereina vesiliuoksissa. Konsentraation kasvaessa yllä k. kriittisen misellikonsentraation (*critical micelle concentration*, CMC) detergenttimolekyylit muodostavat tietyn kokoisia aggregaatteja, joita kutsutaan miselleiksi. Misellin yksinkertaistettu kaksiulotteinen kaaviokuva on esitetty kuvassa 5. Misellit ovat itsejärjestyviä kolloidaalisia partikkeleja, joissa on molekyylien hydrofobiset päät ovat partikkelin sisällä ja hydrofiiliset päät ulkopuolella (Torchilin, 2007). Misellien koko määräytyy detergentin ominaisuuksien mukaan. Kirjallisuudessa detergenttimisellien koko n kertoo kuinka monta detergenttimolekyyliä keskimäärin muodostaa yhden misellin. Lisäksi misellien kokoon ja kriittiseen misellikonsentraatioon vaikuttavat detergenttiliuoksen ionipitoisuus ja lämpötila. (Arnold & Linke, 2007)



Kuva 5. Misellin rakenne kaksiulotteisesti esitettynä (Gusev, et al., 2011).

Detergentin nk. sameutumispiste (*cloud point*, CP) saavutetaan kasvattamalla detergentin konsentraatiota tai muuttamalla lämpötilaa tai suolakonsentraatiota. Tällöin misellaarinen liuos muuttuu sameaksi. Misellit muodostavat aina vain suurempia aggregaatteja, jotka erottuvat vesipohjaisesta faasista. Detergentin ominaisuuksista riippuen detergenttirikas faasi voi olla samea tai kirkas ja sijaita vesipohjaisen faasin ylä- tai alapuolella riippuen detergentin tiheydestä. (Arnold & Linke, 2007)

3.1.1 Triton X-114

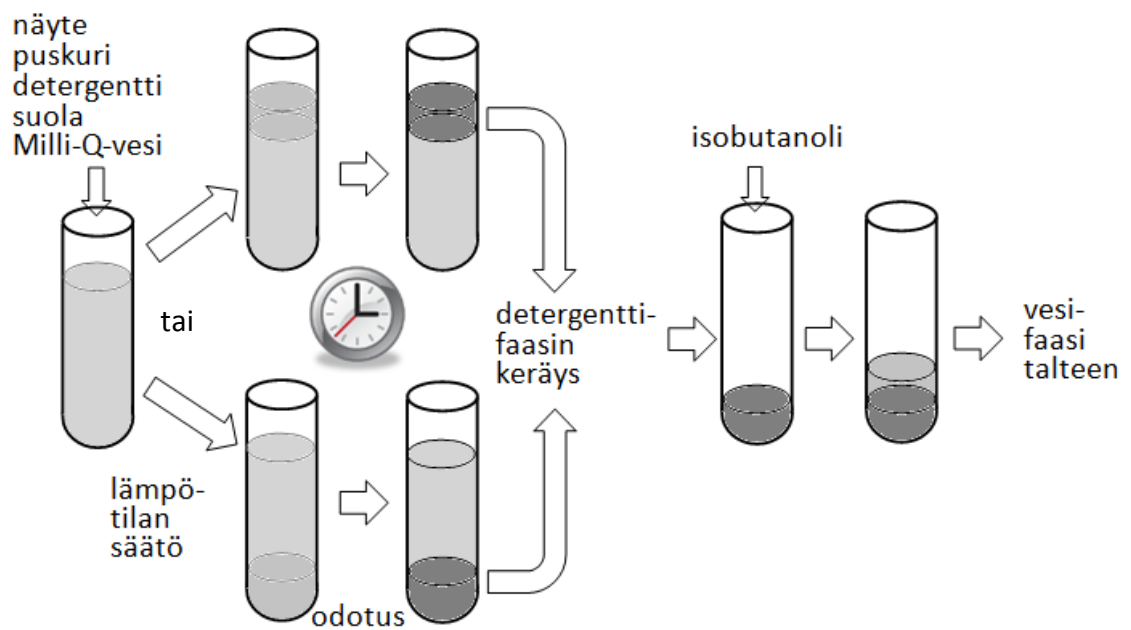
Triton X-114 kuuluu detergenttien jaottelussa Triton-perheeseen. Perheeseen kuuluvat detergentit ovat tert-oktyylifenolipolyetyleeniglykolieettereitä. Triton X-114:n sameutumispiste on 23 °C ja aineen muodostamien misellien koko 7 – 8 molekyyliä yhdessä misellissä. Triton X-144:n kriittinen misellikonsentraatio on 0,2 mM huoneenlämmössä. Lisäämällä 20 % glyserolia voidaan sameutumispiste laskea 4 °C:seen (Arnold & Linke, 2007). Tiheys 20 °C:ssa on 1060 kg/m³ eli Triton X-114 on tiheämpää kuin vesi, jonka tiheys on 998,2 kg/m³ 20 °C:ssa. (Sigma-Aldrich, 2014), (SImetric, 2013)

3.1.2 Berol 266

Berol 266 on kemialliselta nimeltään C9 – 11 alkoholietoksilaatti. Berol 266:n tiheys on 980 kg/m³ 20 °C:ssa eli pienempi kuin vedellä. Tämän vuoksi Berol-faasi muodostuu vesipohjaisen faasin yläpuolelle. Sameutumispiste Berol-266:lla on 24 – 29 °C. (AkzoNobel, 2014)

3.2 Hydrofobiinin käyttö kaksifaasierotusmenetelmässä

Hydrofobiiniavusteinen erotusmenetelmä perustuu hydrofobiseen vuorovaikutukseen. Hydrofobialla tarkoitetaan sitä, että esimerkiksi aminohappojen poolittomat sivuketjut välttelevät vettä ja järjestäytyvät siten, että niiden kontaktit veden kanssa ovat mahdollisimman vähäisiä (Laatikainen, 2002). Hydrofobiiniavusteinen erotusmenetelmä hyväksikäyttää hydrofobisia kalvoja muodostavaa proteiinia. Fuusioimalla kalvoja muodostavaan proteiiniin haluttu kohdeproteiini voidaan hyväksikäyttää kalvoja muodostavan proteiinin ominaisuuksia erotuksessa. Kalvoproteiinit ovat hydrofobisia ja hakeutuvat detergenttifaasiin. Detergenttimolekyylit hakeutuvat toistensa lisäksi kohti hydrofobisia proteiineja, sitoutuvat näiden hydrofobisiin kohtiin ja sulkevat nämä misellien sisään. Misellien aggregoituessa sameutumispisteessä proteiinit jäävät suurimmaksi osaksi detergenttifaasiin. Detergenttifaasi otetaan talteen ja proteiini irrotetaan detergentistä lisäämällä isobutanolia, jolloin detergentti liukenee vapauttaen proteiinin ja muodostuu uudelleen kaksi faasia: vesipohjainen faasi ja sen yläpuolelle alkoholifaasi. Alkoholista liukenee kuitenkin myös vesipohjaiseen faasiin. Erotusta voidaan avustaa sentrifugoimalla pienillä g-arvoilla. Kuvassa 6 on esitetty yksinkertaistettuna hydrofobiiniavusteinen kaksifaasierotusmenetelmä.



Kuva 6. Hydrofobiiniavusteisen erotusmenetelmän kaaviokuvio, jossa on kuvattuna detergenttifaasin muodostuminen sekä vesipohjaisen faasin ylä- että alapuolelle. Detergenttifaasin paikka määräytyy sen ominaisuuksien perusteella.

Isobutanolikäsittelyn jälkeen muodostuva vesipohjainen faasi on se, johon kohdeproteiinin halutaan suurimmaksi osaksi uuttuvan. Kaikista prosessin aikana muodostuvista faaseista otetaan talteen näytteet, joita analysoimalla voidaan seurata kohdeproteiinin kulkua prosessissa.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia eri parametrien vaikutusta hydrofobiiniavusteiseen kaksifaasiuuttoon. Tutkimuksen kohteena oli puskurikonsentraation, eri suolojen ja niiden konsentraatioiden sekä isobutanolipitoisuuden vaikutus puhdistettavan proteiinin saantoon ja entsyymiaktiivisuuteen. Uuttokokeet suoritettiin kahdella eri detergentillä ja vertailtiin näitä keskenään.

4.1 Hiivasolujen hajotus

Hajotettiin GOX:a tuottaneita *P. pastoris* –hiivasoluja (tunniste 31161P) soluprässillä (Thermo French Press Cell Disrupter). Punnittiin 56,11 g pakastettua solumassaa ja liuotettiin se 56 millilitraan Milli-Q-vettä. Hajotettiin solut soluprässillä noin 30 millilitran erissä noin 140 000 kPa:n kammiopaineessa. Solujen hajoamisen varmistamiseksi näyte ajettiin kolme kertaa laitteen läpi.

Sentrifugoitiin lysaattia Sigma 6K15 -sentrifugilla 10 000 g:n voimalla 30 minuutin ajan 4 °C:ssa. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti kerättiin talteen ja pakastettiin – 20 °C:seen 5 millilitran erissä.

4.2 Hydrofobiiniavusteinen kaksifaasierotusmenetelmä

Näyte valmisteltiin sentrifugoimalla sulatettua hiivasolulysaattia 16 000 g:n voimalla minuutin ajan. 15 ml:n säilöputkeen punnittiin 0,4 g detergenttiä (Triton X-114, Sigma tai Berol 266, AkzoNobel). Säilöputkiin lisättiin Milli-Q-vettä, Na-fosfaattipuskuria (pH 7), näytettä ja suolaa. Lopputilavuus tasattiin 10 ml:aan Milli-Q-vedellä. Normaaliolosuhteissa näytettä oli 1 ml, 2 M NaCl:a 1370 µl, 500 mM Na-fosfaattipuskuria 400 µl ja Milli-Q-vettä n. 7 ml. Tällöin suolakonsentraatio oli 274 mM ja puskurikonsentraatio 20 mM. Seosta sekoitettiin voimakkaasti, kunnes se oli visuaalisesti täysin tasaista. Sekoituksen tarkoituksena oli saada detergenttimolekyylit jakautumaan mahdollisimman tasaisesti seokseen.

Edellä kuvatun uuttoliuoksen sisältävät säilöputket asetettiin vesihauteeseen faasiutumaan noin puoleksitoista tunniksi. Tritonin kanssa käytettävä erottumis-

lämpötila on 23 °C ja Berolin 27 °C. Erottumisen jälkeen kirjattiin ylös faasien tilavuudet ja faaseista otettiin 200 µl:n näytteet, jotka pakastettiin.

Berolia sisältävistä putkista siirrettiin yläfaasi uuteen säilöputkeen. Tritonia sisältävistä putkista poistettiin tarpeeton yläfaasi tarkasti. Detergenttifaasien siirto toiseen uutovaiheeseen ei ole täydellinen, joten menetetty tilavuus kirjattiin ylös. Ainoastaan detergenttifaasin sisältäviin säilöputkiin lisättiin 4 ml isobutanolia (J. T. Baker) ja sekoitettiin jälleen voimakkaasti. Putkissa olevan seoksen annettiin jälleen faasiutua vesihauteessa noin 10 minuuttia. Faasiutumisen edistämiseksi putkia sentrifugoitiin 2000 g:n voimakkuudella 5 minuutin ajan. Sentrifugointi ei juurikaan edistänyt faasiutumista, mutta sakkaa ilmestyi useissa tapaksissa faasien rajalle, jolloin faasit ovat helpommin erotettavissa.

Faasien koot kirjattiin jälleen ylös ja niistä otettiin 200 µl:n näytteet, jotka pakastettiin myöhempää analysointia varten. Sulatuksen jälkeen näytteistä mitattiin entsyymiaktiivisuus, kokonaisproteiinimäärät ja joissakin tapauksissa tehtiin SDS-PAGE ja Western Blotting.

4.2.1 Puskurikonsentraation optimointi

Tutkittiin Na-fosfaattipuskurikonsentraation (pH 7) vaikutusta uuttoon ja valittiin sopiva konsentraatio muihin testeihin. Testattavat puskurikonsentraatiot olivat 0 mM, 10 mM, 20 mM ja 40 mM.

Säilöputkiin lisättiin 0, 200, 400 tai 800 µl 500 mM puskuria. Suolakonsentraatio oli 274 mM ja suolana käytettiin NaCl:a (Fisher Scientific). Faasinäytteistä mitattiin GOX-entsyymiaktiivisuuden lisäksi kokonaisproteiinipitoisuus BCA-menetelmällä. Lisäksi 10 mM ja 40 mM puskuria sisältävistä näytteistä tehtiin Western Blotting.

Tulosten perusteella päätettiin jatkaa uuttokokeita 10 mM tai 20 mM puskurilla. Lisäkoee osoitti paremmaksi puskurivahvuudeksi 20 mM. 10 mM puskurivahvuutta käytettäessä ainoastaan vahvimman suolakonsentraation (400 mM) sisältävät säilöputket faasiutuivat ja suolapitoisuuskokeissa vertailu ei täten olisi ollut mahdollista.

4.2.2 Eri suolojen ja niiden konsentraation vaikutus

Tutkittiin eri suolojen ja niiden konsentraation vaikutusta uuttoon. Testattavat suolat olivat natriumkloridi (NaCl, Fisher Scientific), ammoniumkloridi (NH₄Cl, Merck) ja kaliumkloridi (KCl, Scharlau) konsentraatioilla 50 mM, 100 mM, 200 mM ja 400 mM.

Na-fosfaattipuskurivahvuudeksi oli edellisten kokeiden perusteella valittu 20 mM. Säilöputkiin, joissa oli 1 ml näytettä, 400 µl puskuria ja 0,4 g detergenttiä lisättiin 2 M suolaliuosta 0, 250, 500, 1000 tai 2000 µl ja tasattiin tilavuus 10 ml:ksi Milli-Q-vedellä.

Faasiutuneista uutoista kirjattiin faasien tilavuudet ylös ja otettiin ensimmäisen ja toisen uuton faaseista 200 µl:n näyte entsyymiaktiivisuus ja kokonaisproteiinimäärityksiin.

4.3 Glukoosioksidaasin entsyymiaktiivisuusmittaus

Yleisin käytetty glukoosioksidaasin entsyymiaktiivisuuden mittaamenetelmä perustuu siihen, että hapellisissa olosuhteissa GOX hapettaa β-D-glukoosin glukonodeltalaktoniksi ja vetyperoksidiksi (H₂O₂). Vetyperoksidi käytetään edelleen yhdessä piparjuuriperoksidaasin kanssa hapettamaan väriä muodostava substraatti (ATBS) sekundaarireaktiossa. Tuloksena syntyvän hapettuneen substraatin pitoisuus mitataan spektrofotometrisesti. (Bankar, et al., 2009)

Opinnäytetyössä faaseista kerätyistä näytteistä valmistettiin laimennoksia 50 mM natriumfosfaattipuskuriin sopivan entsyymiaktiivisuuden saavuttamiseksi. Näytteitä verrataan GOX-standardeihin, joiden aktiivisuus on 0 – 500 µU/µl. U on entsyymin määrä, joka tarvitaan katalysoimaan 1 µM substraattia minuutissa. Standardeja ja näytteitä pipetoitiin 10 µl/kuoppa 96-kuoppalevylle. Mittaukset suoritettiin rinnakkaisina.

Valmistettiin reaktiopuskuri yhdistämällä 1,65 til-% 50 mM ATBS:a, 2,29 til-% 0,5 U/µl piparjuuriperoksidaasia, 4,57 til-% 20-prosenttista glukoosia ja 91,5 til-% natriumfosfaattipuskuria. Lisättiin yhdenaikaisesti monikanavapipetillä 240 µl

reaktiopuskuria per kuoppa ja mitattiin absorbanssi Victor-monileimalaskijalla (Wallac Oy) aallonpituudella 405 nm eri aikapisteissä reaktiopuskurin lisäyksenä.

4.4 SDS-PAGE

Geielektroforeesissa proteiinit kulkeutuvat polyakryyliamidigeelissä sähkövirran avustamana. Kulkeutuminen riippuu sähkövirran suuruudesta, molekyylin varauksesta, massasta ja muodosta, sekä geelin tiheydestä. SDS-PAGE:ssa (natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelelektroforeesi) proteiinit denaturoidaan, jolloin niiden kulkeutumiseen vaikuttaa enää niiden molekyylimassa. (Boyer, 2000)

SDS-PAGE:ssa proteiinit käsitellään niin, että niiden varaukset tasoittuvat. Natriumdodekyylisulfaatti yhdessä lämpökäsittelyn kanssa hajottaa proteiinin sekundäärisen, tertiäärisen ja kvartenäärisen rakenteen niin, että jäljelle jää suora polypeptidiketju. Merkaptotaanoli tai ditiotreitol (DTT) avustaa disulfididosten rikkomisessa. Negatiivisesti varautuneet SDS-detergenttimolekyylit sitoutuvat denaturoituneiden proteiinien hydrofobisiin kohtiin peittäen proteiinin luonnollisen varauksen. Grammaan proteiinia sitoutuu keskimäärin 1,4 g SDS-molekyyliä. (Boyer, 2000)

Opinnäytetyössä lisättiin laimennettuihin näytteisiin latauspuskuria 25 % näytteen tilavuudesta. Puskurina käytettiin kuusinkertaista Laemmli-puskuria (liite 1), johon on lisätty DTT:tä. Näytteitä kuumennettiin 90 °C:ssa 10 minuutin ajan, jolloin lämpö ja latauspuskuri denaturoivat näytteen proteiinit. Denaturoituja näytteitä sentrifugoitiin 16 000 g:n voimalla minuutin ajan, jotta mahdollinen sakka painuu pohjaan.

Käytettiin BIO-RAD:n valmiiksi valettuja Mini-Protean[®] TGX[™] -gradienttigelieitä (akryyliamidipitoisuus 4 – 15 %). Kasattiin geelit ajolaitteen kehikkoihin ja täytettiin ajoallas SDS-ajopuskurilla (liite 1). Näytteet (15 µl) ja markkeri (5 µl, molekyylipainostandardi) pipetoitiin kaivoihin ja erotettiin proteiineja 200 V:n jännitteellä kunnes näytteiden etenemisrintama saavutti geelin alareunan. Näytteiden

etenemistä verrattiin BIO-RAD:n Precision Plus Protein Dual Color Standards – markkeriin (#161-0374), jonka proteiinivyöhykkeiden molekyylikoot tunnetaan ja vyöhykkeet ovat näkyvissä ajon aikana. Jos geeli ei jatkanut vasta-ainetunnistukseen, se sinivärjättiin Acqua Stain –väriliuoksella (Bulldog-Bio), joka tuo näytteiden kaikki proteiinivyöhykkeet esiin riippumatta proteiinista.

4.5 Western Blotting

Western Blotting on proteiinien immunologinen tunnistusmenetelmä, joka soveltuu proteiinien kvalitatiiviseen määrittelyyn. Ennen Western Blotting:a näyte fraktioidaan SDS-PAGE:lla. Seuraavaksi proteiinit siirretään geeliltä kalvomatriisille, joka on joko nitroselluloosaa, nylonia tai polyvinyylidifluoridia (PVDF) (Boyer, 2000). Opinnäytetyössä käytettiin Immun-BlotTM-merkkistä PVDF-kalvoa (BIO-RAD), joka esikäsiteltiin metanolilla. PVDF-kalvo sitoo proteiineja voimakkaasti ($125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ja antaa vaalean taustaväri hydrofobisen luonteensa vuoksi (Boyer, 2000). Proteiinit siirrostettiin kalvolle sähkövirran avulla. Kasetteihin kasattiin vuorotellen Whatman-paperia, geeli ja kalvo. Kasetti asetettiin siirtopuskurilla (liite 1) täytettyyn ajoaltaaseen, jossa platinaelektrodit johtavat sähkövirran kasetin läpi ja aiheuttavat proteiinien siirtymisen geeliltä kalvolle. Proteiineja siirrostettiin 100 V:n jännitteellä tunnin ajan.

Siirretyt proteiinit havaittiin kalvolta vasta-aineiden avulla. Siirrostuksen jälkeen kalvon vapaat proteiinia sitovat kohdat täytettiin ns. blokkaamalla kalvo maidon proteiineilla (rasvaton maitojauhe, Valio). Tämä estää vasta-aineiden sitoutumisen muualle kuin haluttuun proteiiniin. Blokkauksen jälkeen kalvo huuhdeltiin 1x PBS:llä (liite 1). Tämän jälkeen kalvoa inkuboitiin kohdeproteiinille tarkoitettussa primäärivasta-aineliuoksessa (liite 1). Vasta-aine sitoutuu kohdeproteiiniin muodostaen antigeeni-primäärivasta-aine -kompleksin. Tämä reaktio ei yleensä johda havaittavaan signaaliin, joten kalvoa inkuboidaan sekundäärivasta-aineliuoksessa. Inkubointien välissä kalvo pestiin 1x PBST:llä (liite 1). Sekundäärivasta-aine tunnistaa primäärisen vasta-aineen spesifisesti. Sekundäärinen vasta-aine (liite 1) on leimattu eli konjugaatti, joten se voidaan havaita. Primäärivasta-ainekin voi olla leimattu, jolloin ei tarvita sekundääristä vasta-ainetta.

Leimana on yleensä entsyymi, joka tämän opinnäytetyön tapauksessa oli alkalinen fosfataasi. Kun kalvo käsiteltiin substraattiliuoksella (liite 1), entsyymi katalysoi reaktion, jossa muodostui näkyvä (värillinen) sakkautuva tuote kalvolle. Ennen entsyymireaktiota kalvo pestiin 1x PBST:llä ja ja huuhdeltiin AP-puskurilla (liite 1). Reaktion ja värinmuodostamisen pysäyttämiseksi kalvo huuhdeltiin Milli-Q-vedellä. (Boyer, 2000)

4.6 Proteiininmääritys BCA-menetelmällä

Näytteistä määritettiin kokonaisproteiinipitoisuudet spesifisen aktiivisuuden seuraamiseksi uuton eri vaiheissa. Käytettiin Thermo Scientific:n kaupallista Pierce® BCA Protein Assay -menetelmää. Standardeina käytettiin BSA-liuoksia (naudan seerumin albumiini), joiden proteiinipitoisuus tunnetaan.

Proteiinit reagoivat BCA:n ja Cu^{2+} -ionin kanssa, josta muodostuu Cu^{+} -ioneja. Cu^{+} -ionit kelatoituvat BCA:n vaikutuksesta, jolloin reagoimaton vihertävä BCA muuttuu violetiksi kupari-BCA –kompleksiksi, jonka pitoisuus mitataan spektrofotometrisesti. (Boyer, 2000)

Näytteet laimennettiin Milli-Q-veteen. Pipetoitiin standardeja ja näytteitä 96-kuoppalevyille 25 μl /kuoppa ja lisättiin jokaiseen kuoppaan 200 μl kaupallista reaktioliuosta (reaktioliuos A + B, 50:1). Levyä sekoitettiin levyravistelijassa ja inkuboitiin 37 °C:ssa 30 minuutin ajan.

Inkuboinnin jälkeen levyn annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi. Tämän jälkeen värinmuodostus mitattiin spektrofotometrisesti käyttäen aallonpituutta 562 nm. Tuntemattomia näytteitä verrattiin tunnettuihin standardeihin.

4.7 Isobutanolin vaikutus entsyymiaktiivisuuteen

Tuotetun proteiinin irrotukseen detergentistä käytetään isobutanolia, josta jää noin 9,5 til-% vesipohjaiseen faasiin sen vesiliukoisuuden vuoksi (Chemicaland21, 2013). Isobutanolin vaikutusta entsyymiaktiivisuuteen tutkittiin lisäämällä eri tilavuusprosentteja isobutanolia proteiininäytteeseen. Proteiininäytteenä on kaksifaasierotusmenetelmänkin lähtönäytteenä oleva hiivasolu-

lysaatti. Isobutanolia lisättiin 2,5, 5, 7,5, tai 10 til-%. Lisäyksen jälkeen näytteitä inkuboitiin noin tunti huoneenlämmössä. Näytteet pakastettiin ja sulatettiin, jotta testi vastaisi mahdollisimman hyvin uuttonäytteiden normaalia käsittelyä.

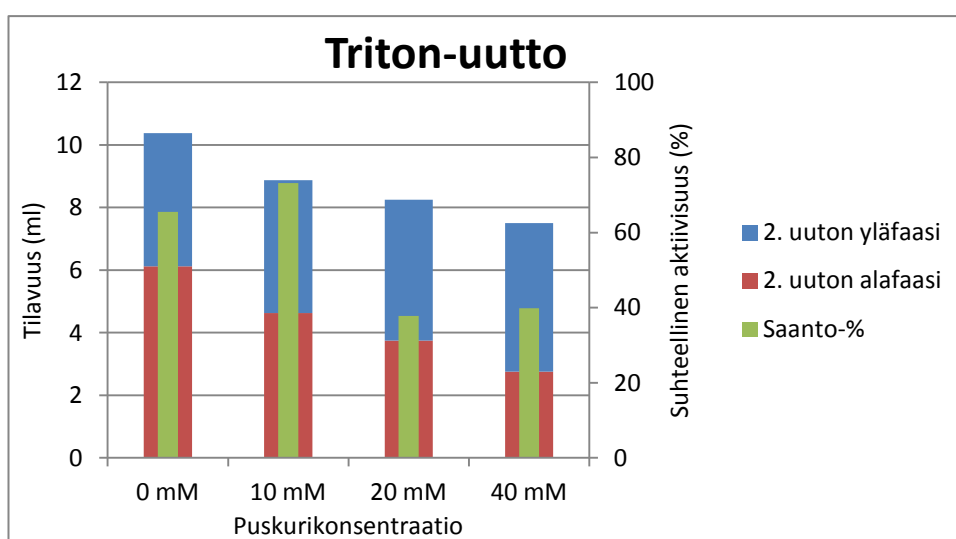
Sulatetut näytteet laimennettiin 50 mM:seen Na-fosfaattipuskuriin. Tällöin 2,5 til-% isobutanolia sisältävä näyte korreloi mittausta varten laimennetun 2. uuton proteiinirikastetun faasin alkoholipitoisuutta useimmissa tapauksissa. Laimennetuista näytteistä mitattiin entsyymiaktiivisuus edellä kuvatulla menetelmällä.

5 TULOKSET JA TULOSTEN ANALYYSINTI

Tuloksissa esitetyt kuviot edustavat entsyymimääritysten tuloksia. Saantoprosentti ilmoittaa kuinka paljon alkunäytteen aktiivisuudesta on jäljellä loppunäytteessä.

5.1 Puskurivahvuuden optimointi

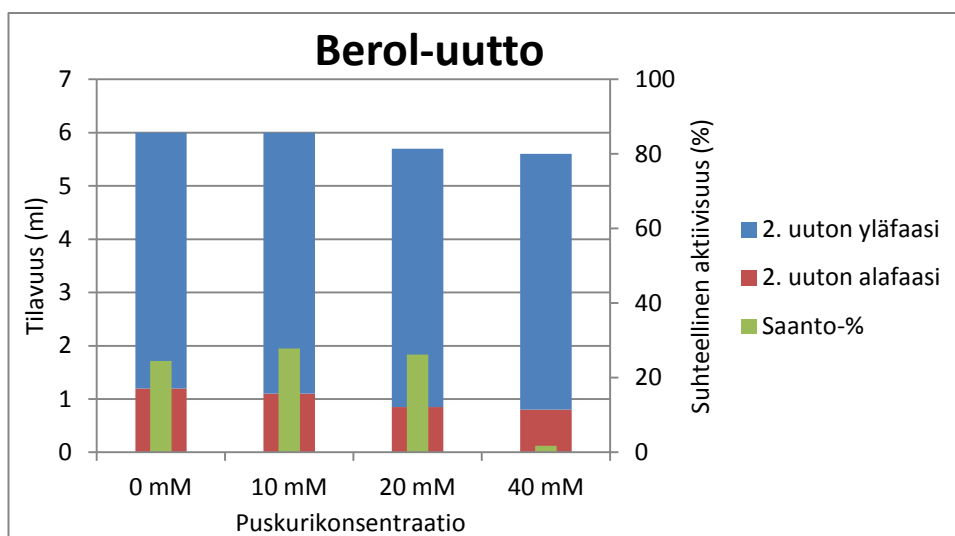
Kuvioissa 1 ja 2 on esitetty puskurivahvuuden vaikutus faasien kokoon toisessa uutossa sekä tuotteen saantoprosentti verrattuna lähtönäytteeseen.



Kuvio 1. Puskurikonsentraation vaikutus Triton-uuton saantoon ja faasien kokoon.

Puskurivahvuus vaikuttaa detergenttifaasin kokoon sekä Triton X-144:llä että Berol 266:lla tehdyssä uutossa. Puskurikonsentraation kasvaessa faasin tilavuus pienenee. Suurin saantoprosentti (~70 %) Triton-uutossa saavutetaan 10 mM puskurivahvuudella. Tällöin haluttu faasi on tilavuudeltaan (n. 4,5 ml) kuitenkin vielä melko kookas verrattuna lähtötilavuuteen (10 ml). 20 mM ja 40 mM konsentraatioissa halutun faasin tilavuus on jo selkeästi alle puolet lähtötilavuudesta. Näissä konsentraatioissa saanto on keskiarvoltaan melko samalla tasolla (~40 %), mutta 40 mM konsentraatioissa toistettavuus alkaa kärsiä ja saanto vaihtelee paljon tippuen välillä olemattomaan. Spesifinen aktiivisuus, joka tarkoittaa kohdeproteiinin osuutta kokonaisproteiinimäärässä, kasvaa kaikissa

näytteissä melko samassa suhteessa. Tämä on havaittavissa puhdistustaulukoista (liite 2).



Kuvio 2. Puskurikonsentraation vaikutus Berol-uuton saantoon ja faasien koon.

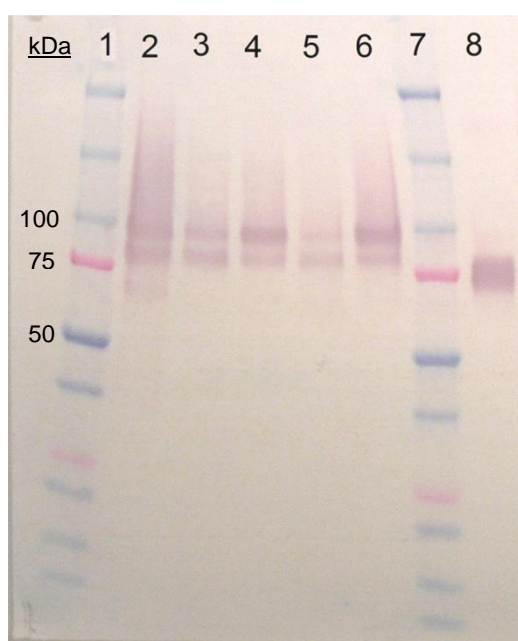
Berol-uutossa suurin saantoprosentti saavutetaan samoin kuin Triton-uutossa myös 10 mM puskurivahvuudella, mutta saannot jäävät Triton-uuton vastaavista. Saantoprosentti on kuitenkin lähes sama myös 20 mM puskurivahvuudella ja puskuroimattomalla uutolla (~25 %). 40 mM puskurivahvuudessa saanto (~2 %) tippuu jyrkästi. Optimaalisin lopputulos saavutetaan siis 20 mM puskurivahvuudessa, jolloin saanto on hyvin lähellä suurinta ja faasi konsentroituin suurimman saannon antaneista konsentraatiovaihtoehdoista. Spesifinen aktiivisuus kasvaa samassa suhteessa muissa uutoissa, paitsi 40 mM puskuroinnilla tehdyssä, jossa se tippuu huonon saannon takia.

Suuren mittakaavan tuotantoa varten haluttujen faasien tulisi olla mahdollisimman pieni verrattuna uuton lähtötilavuuteen, koska pientä tilavuutta on helpompi käsitellä. Uutto vaatii puskuroinnin, jotta esimerkiksi erottumisvaiheen lämpötilan säätö ei aiheuta epäedullista pH:n muutosta. 10 mM puskurivahvuudella päästään suurimpiin saantoihin, mutta suolakonsentraatiokokeiden myötä huomattiin, että niin pienellä puskuroinnilla vain suuren suolakonsentraation uutot erottuvat. Suolan kulutus ja uuton kustannukset siis kasvavat. 40 mM puskuroinnilla saanto on huonon saannon takia.

roinnilla rinnakkaisten uuttojen saantojen välille syntyy suuria eroja eli toistettavuus kärsii. Täten optimaaliseksi puskurikonsentraatioksi valikoitui 20 mM.

5.1.1 Western Blotting puskurioptimoinnin näytteillä

Vasta-ainemäärityksessä vertailtiin pienen ja korkean puskurikonsentraation näytteitä. Tarkoituksena oli nähdä sisältävätkö näytteet haluttua kohdeproteiinia (GOX) ja vaikuttaako puskurikonsentraatio tämän uuttumiseen. Tulokset ovat esitetyt kuvassa 7 ja 8.



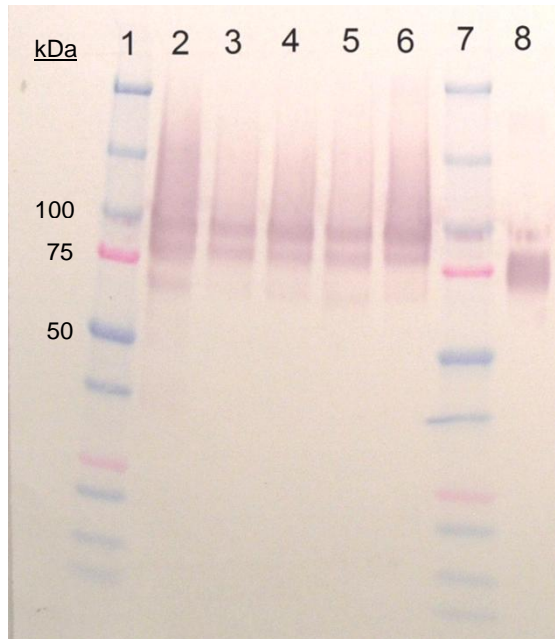
Kuva 7. Triton-uuton puskurioptimoinnin näytteillä tehty Western Blotting, jossa 1) markkeri, 2) lähtönäyte, 3) 10 mM puskuroitu 1. uuton yläfaasi, 4) 10 mM puskuroitu 2. uuton alafaasi, 5) 40 mM puskuroitu 1. uuton yläfaasi, 6) 40 mM puskuroitu 2. uuton alafaasi, 7) markkeri, 8) positiivinen kontrolli.

Kuvassa 7 näkyvä positiivinen kontrolli (kaivo 8) ja näytteiden (kaivot 2 – 6) alempi näkyvä proteiinivyöhyke ovat hyvin saman kokoisia, joten voidaan päätellä vyöhykkeiden olevan glukoosioksidaasia. Vyöhykkeet ovat myös oikean kokoisia (75 – 80 kDa). Ylemmät proteiinivyöhykkeet ovat todennäköisesti GOX-hydrofobiini -fuusioproteiinia, sillä niiden molekyylimassa on noin 10 kilodaltonia eli hydrofobiinin molekyylimassan verran suurempi kuin GOX:n. Kaksi erikokoista vyöhykettä kertoo, että fuusioproteiini on osittain hajonnut ja hydro-

fobiini irronnut. Jo lähtönäytteessä on havaittavissa kaksi vyöhykettä, joten proteiini voi katketa tuoton aikana tai soluhajotuksen yhteydessä. Hydrofobiinin läsnäolon voisi todeta tekemällä näytteestä vasta-ainemääritys käyttämällä spesifistä vasta-ainetta hydrofobiinille.

Kuvan 7 kaivoissa 3 ja 5 on näytteet vesipohjaisista faaseista. Näissä alempi proteiinivyöhyke on hiukan vahvempi kuin ylempi. Hydrofobiinista irronnut GOX kulkeutuukin vesipohjaiseen faasiin hydrofiilisuuksiensa vuoksi. Hydrofobiini puolestaan kuljettaa siihen sitoutuneen GOX:n suurimmaksi osaksi hydrofobiseen faasiin, joten hydrofobiini-GOX:ia ei näy paljon vesifaasissa. Kaivot 4 ja 6 puolestaan osoittavat fuusioproteiinin kulkeutumisen haluttuun faasiin. Vahvemmalta puskuroinnilla proteiinia näyttäisi uuttuvan tehokkaammin, sillä sitä on vähemmän havaittavissa 1. uuton vesipohjaisessa faasissa kuin laimeamman puskuroinnin vastaavassa näytteessä.

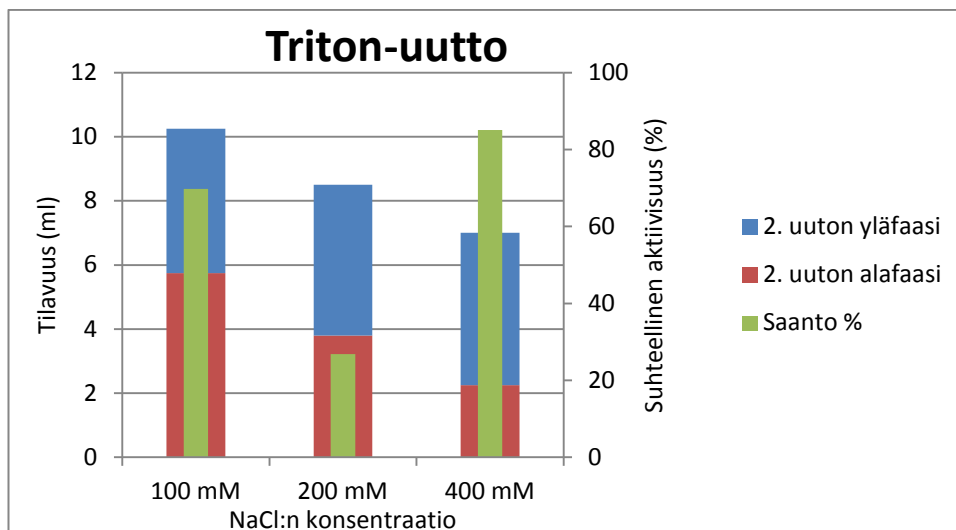
Berol-uuton vasta-ainemääritys (kuva 8) näyttää hyvin samankaltaiselta kuin Triton-uuton vastaava. Vyöhykkeiden välillä on tosin vähemmän vahvuuseroa, eikä puskurikonsentraatiokaan näyttäisi vaikuttavan yhtä paljon. Berol-näytteissä ylempi proteiinivyöhyke on aina vähintään yhtä vahva kuin alempi, joten fuusioproteiini saattaa olla ehjänä enemmän kuin Triton-näytteissä. Vahva ylempi proteiinivyöhyke 1. uuton vesifaasissa kertoo tosin proteiinin päätyvän vesifaasiin halutun detergenttifaasin sijaan.



Kuva 8. Berol-uuton puskurioptimoinnin näytteillä tehty Western Blotting, jossa 1) markkeri, 2) lähtönäyte, 3) 10 mM puskuroitu 1. uuton alafaasi, 4) 10 mM puskuroitu 2. uuton alafaasi, 5) 40 mM puskuroitu 1. uuton alafaasi, 6) 40 mM puskuroitu 2. uuton alafaasi, 7) markkeri, 8) positiivinen kontrolli.

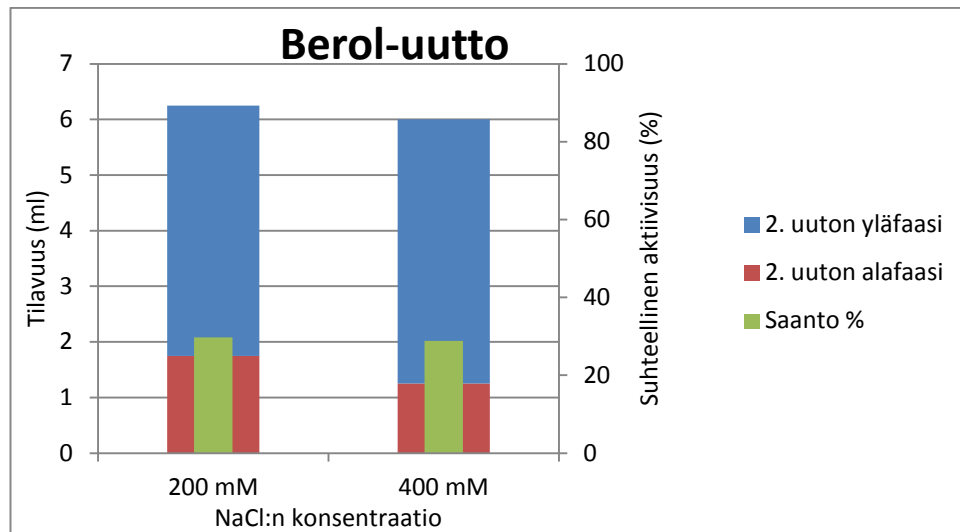
5.2 Natriumkloridin ja sen konsentraation vaikutus

Kuvioissa 3 ja 4 on esitetty natriumkloridin konsentraation vaikutus faasien koon toisessa uutossa sekä tuotteen saantoprosenttiin verrattuna lähtönäytteeseen.



Kuvio 3. Natriumkloridipitoisuuden vaikutus Triton-uuton saantoon ja faasien kokoon.

Ainoastaan kolmen suurimman suolapitoisuuden (100, 200 ja 400 mM) uutot faasiutuvat. 200 mM:n suolapitoisuudessa huomataan suuri lasku saannossa verrattuna 100 ja 400 mM:n suolapitoisuuteen. Kyseessä voi olla suola- ja puskurikonsentraation yhdistelmä, jossa proteiini sakkautuu ja inaktivoituu, tai kyseessä on virhe kokeen suorituksessa. Suurin saanto saadaan 400 mM natriumkloridikonsentraatiolla. Suuresta suolapitoisuudesta on etua myös faasin tilavuuden pienentyessä. Kuten kuvioista 3 ja 4 käy ilmi, suolakonsentraation kasvu vaikuttaa selkeästi uuton proteiinirikkaan faasin tilavuuteen pienentävästi. Myös spesifinen aktiivisuuden kasvu on huomattavissa puhdistustaulukosta (liite 2).

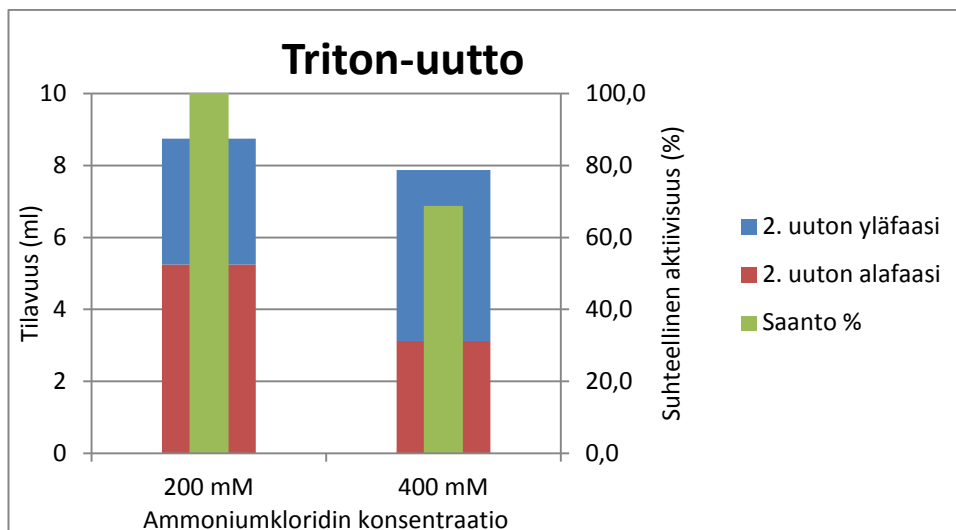


Kuvio 4. Natriumkloridin vaikutus Berol-uuttoon.

Berol-uutoissa ainoastaan kahden suurimman suolakonsentraation (200 ja 400 mM) uutot faasiutuvat. Saanto on kummallakin konsentraatiolla lähes sama (~30 %). Aktiivisuudet ovat jälleen pienemmät kuin Triton-uutoissa vastaavilla olosuhteilla. Spesifinen aktiivisuus on hyvin samaa tasoa natriumkloridin konsentraatiosta riippumatta.

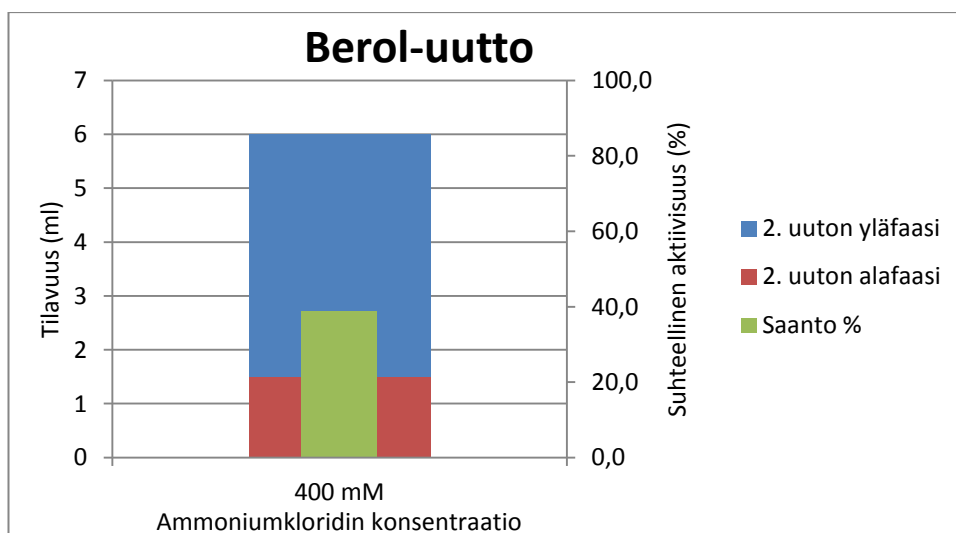
5.3 Ammoniumkloridin ja sen konsentraation vaikutus

Kuvioissa 5 ja 6 on esitetty ammoniumkloridin konsentraation vaikutus faasien kokoon toisessa uutossa sekä tuotteen saantoprosentti verrattuna lähtönäytteeseen.



Kuvio 5. Ammoniumkloridin vaikutus Triton-uuttoon.

Ainoastaan kahden suurimman suolapitoisuuden (200 ja 400 mM) uutot faasiutuvat. Suurin saanto (~100 %) saavutetaan 200 mM suolapitoisuudella. Detergenttifaasi on kuitenkin edelleen melko suuri (5,25 ml) verrattuna lähtötilavuuteen (10 ml). 400 mM suolapitoisuudella saadaan pienempi, mutta teolliselle prosessille hyvä saanto (~70 %) yhdessä uuttotilavuuden pienenemisen kanssa. Ammoniumkloridipitoisuudella ei ole vaikutusta spesifiseen aktiivisuuteen.

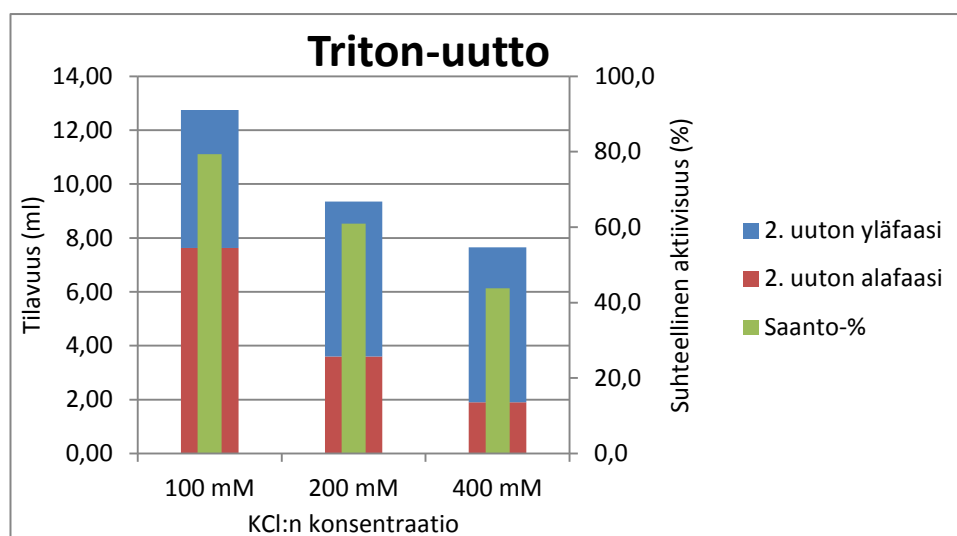


Kuvio 6. Ammoniumkloridin vaikutus Berol-uuttoon.

Berol-uutossa ainoastaan suurimman (400 mM) ammoniumkloridikonsentraation uutot erottuvat. Uuttotilavuuden pieneneminen on voimakasta ja saanto (~40 %) kaikista Berol-uutoista paras. Saanto tosin häviää edelleen selkeästi Tritonin kanssa tehdyille uutoille. Spesifinen aktiivisuus kasvaa aivan samassa suhteessa kuin uutettaessa Triton X-144:lla, kun suolana on ammoniumkloridi. Eri suolakonsentraatioiden vaikutusta ei tässä tapauksessa voi havainnoida, koska ainoastaan yksi näyte faasiutui.

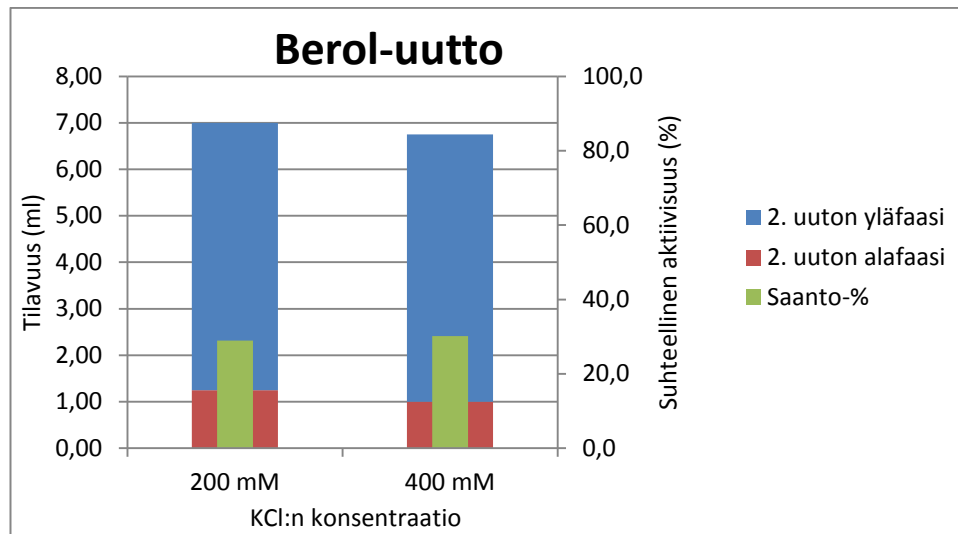
5.4 Kaliumkloridin ja sen konsentraation vaikutus

Kuvioissa 7 ja 8 on esitetty kaliumkloridin konsentraation vaikutus faasien koon toisessa uutossa sekä tuotteen saantoprosentti verrattuna lähtönäytteeseen.



Kuvio 7. Kaliumkloridin vaikutus Triton-uuttoon.

Kolmen suurimman suolapitoisuuden (100, 200 ja 400 mM) uutot faasiutuvat. Faasiutuneiden uuttojen saanto laskee suolakonsentraation kasvaessa, mutta tuotetun proteiinin konsentraatio suurenee faasin tilavuuden pienentyessä. Vaikka saanto laskee, spesifinen aktiivisuus kasvaa kaliumkloridipitoisuuden kasvaessa (kts. liite 2).

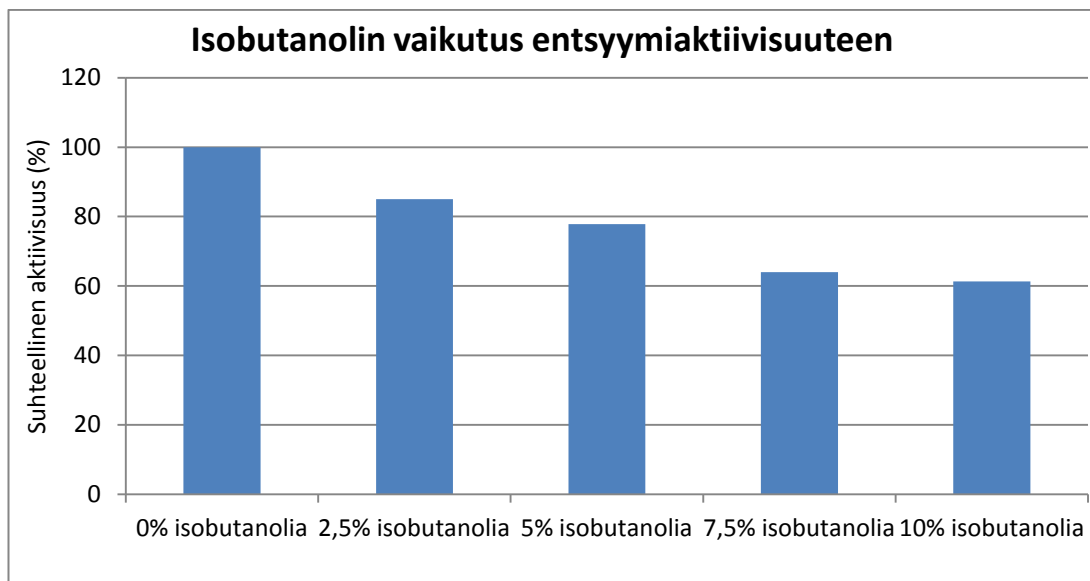


Kuvio 8. Kaliumkloridin vaikutus Berol-uuttoon.

Kahden suurimman kaliumkloridipitoisuuden (200 ja 400 mM) uutot faasiutuvat. Kaliumkloridin pitoisuus ei vaikuta huomattavasti saantoon. Koska proteiiniirikkaan faasin tilavuus pienenee, spesifinen aktiivisuus kasvaa hieman kaliumkloridipitoisuuden kasvaessa.

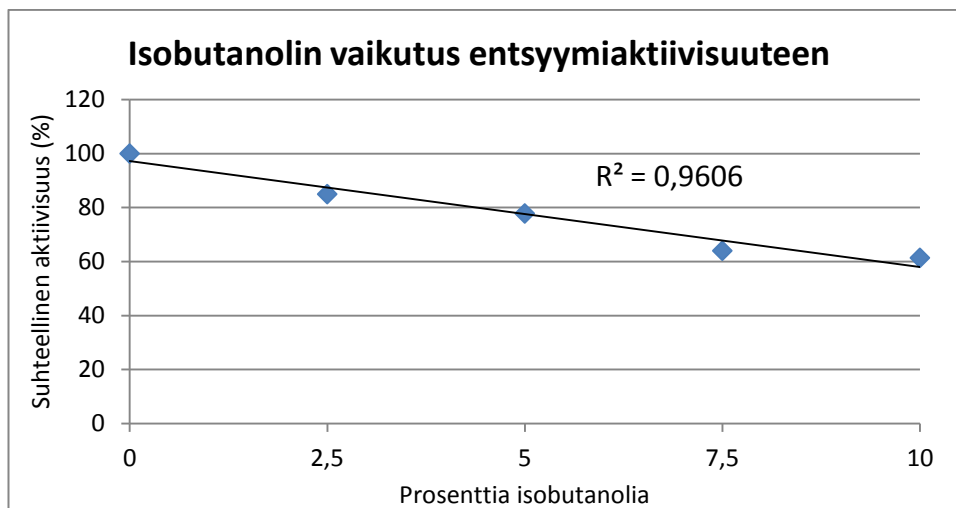
5.5 Isobutanolin vaikutus entsyymiaktiivisuuteen

Kuviossa 9 on esitetty isobutanolipitoisuuden vaikutus entsyymiaktiivisuuteen. Vertailuarvona käytetään isobutanolia sisältämätöntä näytettä.



Kuvio 9. Isobutanolin vaikutus entsyymiaktiivisuuteen.

Isobutanolin pitoisuuden kasvaessa entsyymiaktiivisuus laskee melko tasaisesti. Isobutanolin liukoisuus veteen on 9,5 til-% (Chemicalland21, 2013). 2,5 til-% sisältävässä näytteessä, jossa pitoisuus keskimäärin vastaa laimennetun lopunäytteen isobutanolipitoisuutta, on aktiivisuustaso laskenut jo melkein 20 prosenttiyksikköä. Suurimmalla liukoisella pitoisuudella aktiivisuus on laskenut jo melkein puoleen vertailutasosta. Tästä voidaan päätellä proteiinin irrotusmenetelmän vaikuttavan entsyymiaktiivisuuteen. Kuvio 10 näyttää isobutanolipitoisuuden vaikuttavan lineaarisesti entsyymiaktiivisuuteen tutkitulla pitoisuusalueella.



Kuvio 10. Isobutanolipitoisuuden ja entsyymiaktiivisuuden välinen korrelaatio.

5.6 Yhteenveto

Optimaalisimmaksi Na-fosfaattipuskurikonsentraatioksi valikoitui 20 mM. Tällöin uuton tilavuus pienenee jo huomattavasti loppua kohti ja melko pieni suolapitoisuus riittää faasiutumiseen. Tällä konsentraatiolla uutto on melko toistettava.

Käytettäessä NaCl:a tai KCl:a kolmen suurimman suolakonsentraation (100, 200 ja 400 mM) Triton-uutot erottuivat. Berol-uutoista erottui kahden suurimman suolakonsentraation (200 ja 400 mM) uutot. NH₄Cl:a käytettäessä kahden suurimman suolakonsentraation Triton-uutot ja vain suurimman suolakonsentraation Berol-uutot erottuivat. Triton-uutoissa suurin saanto saatiin 200 mM NH₄Cl:n kanssa. NaCl:a käytettäessä suurin saanto saatiin konsentraatiolla 400 mM ja KCl:a käytettäessä 100 mM. Spesifinen aktiivisuus pääsääntöisesti kasvoi kuitenkin aina suolakonsentraation kasvaessa. Berol-uutoissa kaikkien faasiutuneiden uuttojen saanto-% oli noin 30. Ammoniumkloridia käytettäessä se oli hiukan suurempi kuin muiden suolojen kanssa, mutta spesifinen aktiivisuus ei vaihdellut eri suolakonsentraatioiden välillä. Isobutanolipitoisuus vaikuttaa kääntäen verrannollisesti entsyymiaktiivisuuteen.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Kaksifaasiuutto vaatii sekä puskuria että suolaa, ja näiden yhteenlasketun pitoisuuden tulee olla riittävällä tasolla faasiutumisen aikaansaamiseksi. Uutto vaatii puskuroinnin, jotta olosuhteet pysyvät proteiineille edullisina. Liian vahva puskurointi kuitenkin aiheuttaa huonon toistettavuuden.

Puskuri- ja suolakonsentraatiolla voidaan vaikuttaa faasien kokoon. Konsetraation kasvaessa enemmän vettä siirtyy vesipohjaiseen faasiin ja detergenttifaasin osuus pienenee. Suolakonsentraatio vaikuttaa myös saantoon, mutta vaikutus on suolakohtainen. Spesifinen aktiivisuus kuitenkin kasvaa suolapitoisuuden kasvaessa etenkin uutettaessa Triton X-114:llä, Berol 266:lla kasvu on hyvin vähäistä tai lähes olematonta. Tuotetun GOX-hydrofobiini -fuusioproteiinin puhdistuksessa Triton X-114 antaa suurimman saannon, mutta Berol 266 pienentää uuton kokonaistilavuutta tehokkaammin. Triton faasiutuu pienemmillä suolakonsentraatioilla kuin Berol, mikä pienentää reagenssikustannuksia. Näillä perusteilla Triton X-114 vaikuttaisi soveltuvan vertailluista detergenteistä paremmin tutkittuun menetelmään. Saannon ja spesifisen aktiivisuuden tason pysyminen samana kaikissa Berol-uutoissa voi johtua detergentin kapasiteetin ylittymisestä. Käytetyllä konsentraatiolla detergentti ei ehkä pysty sitomaan enempää proteiinia.

Suoritettujen kokeiden perusteella hydrofobiiniavusteinen erotusmenetelmä on mahdollinen vaihtoehto suuren mittakaavan tuotannossa ja erotuksessa. Erotusmenetelmä on yksinkertainen, nopea ja tehokas edellyttäen, että fuusio-osa ei irtoa tuotetusta proteiinista. Menetelmä ei vaadi kallista laitteistoa: yksinkertainen erotusastia lämpötilan säädöllä ja sekoitusmahdollisuudella riittää. Myös tuottosysteemi on hiivan nopean kasvun ja edullisen mediumin ansiosta hyvin kustannustehokas.

Tällä hetkellä kuitenkin proteiinirikkaan faasin koon kasvu verrattuna lähtönäytteeseen tuottaa ongelmia tilavuuksien kasvaessa tehdastuotannon tasolle. Erotusastioilta vaadittaisiin valtavaa kapasiteettia ja suurten tilavuuksien käsittely voi tulla hankalaksi ja kalliiksi. Kokeiden aikana talteen kerättävän faasin koko

kasvoi jopa 14-kertaiseksi lähtönäytteen tilavuuteen verrattuna. Jotta menetelmä todella olisi kannattava, tulisi proteiininäytteen konsentroitua laimenemisen sijaan eli tilavuuden pienentyä. Pienimmilläänkin lopputilavuus oli kaksinkertainen lähtötilanteeseen verrattuna. Lisää kokeita menetelmän optimoimiseksi laboratoriomittakaavassa ja mahdollisuudesta pienentää haluttua lopputilavuutta on tehtävä ennen suurempaan mittakaavaan siirtymistä. Yksi optimoitava parametri voisi ainakin olla detergentin irroitukseen tarvittavan isobutanolin määrä, jotta se on pienin mahdollinen entsyymiaktiivisuuden säilyttämiseksi, kuitenkin niin, että detergentistä päästään tehokkaasti eroon. Myös vaihtoehtoja detergentin irroitukseen voisi tutkia.

LÄHTEET

AkzoNobel, 2014. *Berol 266 - AkzoNobel Fabric & Cleaning*. [Online] Available at: <http://sc.akzonobel.com/en/fabric-cleaning/Pages/product-detail.aspx?prodID=8224> [Haettu 12. toukokuuta 2014].

Arnold, T. & Linke, D., 2007. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. *BioTechniques*, 43(4), pp. 427-440.

Asenjo, J. & Andrews, B., 2011. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. *Journal of Chromatography A*, Issue 1218, pp. 8826-8835.

Asenjo, J. & Andrews, B., 2012. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. *Journal of Chromatography A*, Issue 1238, pp. 1-10.

Askolin, S., Nakari-Setälä, T. & Tenkanen, M., 2001. Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), pp. 124-130.

Askolin, S., Penttilä, M., Wösten, H. A. & Nakari-Setälä, H., 2005. The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes *hfb1* and *hfb2* have diverse functions in fungal development. *FEMS Microbiology Letters*, 253(2), pp. 281-288.

Bankar, S., Bule, M., Singhal, R. & Ananthanarayan, L., 2009. Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*, Issue 27, pp. 489-501.

Boyer, R., 2000. *Modern Experimental Biochemistry*. 3. painos toim. San Fransisco: Addison Wesley Longman, Inc..

Chemicaland21, 2013. *ISO-BUTANOL (ISOBUTYL ALCOHOL)*. [Online] Available at: <http://www.chemicaland21.com/petrochemical/ISO-BUTANOL.htm> [Haettu 10. toukokuuta 2014].

Crognale, S. ym., 2006. Expression of *Penicillium variabile* P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, Vuosik. 39, pp. 1230-1235.

Fessenden, R. & Fessenden, J., 1998. *Organic Chemistry*. 6. painos toim. Pacific Grove: Brooks/Cole Publishing Company.

Frederick, K. ym., 1990. Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(7), pp. 3793-3802.

Gusev, A. I., Khokhlov, A. R. & Govorun, E. N., 2011. *Glossary of nanotechnology and related terms*. [Online] Available at: <http://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article1199> [Haettu 21 Elokuu 2014].

Khalesi, M. ym., 2012. Hydrophobins: Exceptional proteins for many applications in brewery environment and other bio-industries. *Cerevisia*, 37(1), pp. 3-9.

Laatikainen, R., 2002. *Biotieteellinen fysikaalinen kemia II*. Kuopio: Kuopion yliopisto.

Nelson, D. & Cox, M., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3. painos toim. New York: Worth Publishers.

Seiboth, B., Ivanova, C. & Seidl-Seiboth, V., 2011. *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. Teoksessa: M. A. d. S. Bernardes, toim. *Biofuel Production - Recent Developments and Prospects*. Rijeka: InTech, pp. 309-339.

Sigma-Aldrich, 2014. *Triton X-114*. [Online] Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/93422?lang=en®ion=> [Haettu 24. huhtikuuta 2014].

Slmetric, 2013. *Mass, Weight, Density or Specific Gravity of water at various temperatures C and thermal coefficient of expansion of water*. [Online]

Available at: http://www.simetric.co.uk/si_water.htm
[Haettu 12. toukokuuta 2014].

Terpe, K., 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(5), pp. 523-533.

Torchilin, V. P., 2007. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharmaceutical Research*, 24(1), pp. 1-16.

Wohlfahrt, G. ym., 1999. 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallographica*, 55(5), pp. 969-977.

Käytetyt reagenssit

SDS-PAGE

6x Laemmli sample buffer + DTT

- SDS (Sigma) 0,12 g/ml puskuria
- Bromofenolisininen (Merck) 0,6 mg/ml puskuria
- Glyseroli (Fisher) 0,47 ml/ml puskuria
- 0,5 M Tris-puskuri pH 6,8 0,12 ml/ml puskuria
- Milli-Q-vesi 0,21 ml/ml puskuria
- DTT (BHD) 0,093 g/ml puskuria

10x SDS running buffer

- SDS (Sigma) 10 g
 - Glysiini (Fisher) 144,1 g
 - Tris base (Fisher) 30,3 g
- Liuotetaan litraan Milli-Q-vettä.

Western Blotting

Siirtopuskuri

- Tris base (Fisher) 4,95 g
- Glysiini (Fisher) 21,6 g
- Etanoli (Etax A) 150 ml
- Milli-Q-vesi 1350 ml

10x PBS, pH 7,4

- NaCl (Merck) 80 g
- KCl (Merck) 2 g

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck) 26,8 g
- KH_2PO_4 (Merck) 2,4 g
- Milli-Q-vesi 800 ml
 - pH:n säätö HCl:lla
 - Tilavuus Milli-Q-vedellä litraksi

1x PBS, pH 7,4

- 10x PBS pH 7,4 100 ml
- Milli-Q-vesi 900 ml

1x PBST (1x PBS + 0,1 % Tween)

- 1x PBS pH 7,4 1 litra
- Tween 20 (Bio-Rad) 1 ml

5 % blokkauksreagenssi

- Rasvaton maitojauhe (Valio) 0,75 g
- 1x PBS 15 ml

Primäärivasta-aineliuos

- 1x PBS pH 7,4 + 1 % maitojauhe 3 ml
- Anti-GOX rabbit (LifeSpan BioSciences) 1 μl

Sekundäärivasta-aineliuos

- 1x PBS pH 7,4 + 1 % maitojauhe 10 ml
- Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-AP Conjugate (Bio-Rad) 1 μl

10x AP-detektiopuskuri, pH 8,8

- Tris HCl (Sigma) 24,6 g
- Tris base (Fisher) 102,6 g
- NaCl (Fluka) 5,844 g
- $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck pro analysi) 10,16 g
- Milli-Q-vesi 1000 ml

AP-detektion substraattiliuos

- Nitro blue tetrazolium chloride (NBT) (Promega) 66 μl
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (Promega) 33 μl
- 1x AP-detektiopuskuri 10 ml

Puhdistustaulukot

	Tilavuus ml	Proteiniipitoisuus mg/ml	Tot. proteiini mg	Aktiivisuus U/ml	Tot. aktiivisuus U	Spesifinen aktiivisuus U/mg	Saanto %
alkunäyte	1	39,80	39,80	31,12	31,12	0,78	100
0 mM puskurointi							
a 1. uuton yläfaasi	2,75	2,96	8,14	2,87	7,89	0,97	25,4
a 1. uuton alafaasi	7,25			7,53	54,62		175,5
a 2. uuton yläfaasi	4,25			0,00	0,00		0,0
a 2. uuton alafaasi	6	1,59	10,22	3,43	22,07	2,16	70,9
b 1. uuton yläfaasi	2,5	3,12	7,79	3,13	7,83	1,01	25,2
b 1. uuton alafaasi	7,5			9,53	71,50		229,8
b 2. uuton yläfaasi	4,25			0,00	-0,01		0,0
b 2. uuton alafaasi	6,25	1,59	10,65	2,79	18,71	1,76	60,1
10 mM puskurointi							
a 1. uuton yläfaasi	4,5	3,57	16,07	3,57	16,07	1,00	51,6
a 1. uuton alafaasi	5,5			10,13	55,71		179,1
a 2. uuton yläfaasi	4,5			0,00	-0,01		0,0
a 2. uuton alafaasi	4	1,92	8,45	4,41	19,40	2,30	62,4
b 1. uuton yläfaasi	3,5	3,31	11,58	3,44	12,04	1,04	38,7
b 1. uuton alafaasi	6,5			10,36	67,35		216,5
b 2. uuton yläfaasi	4			0,00	-0,01		0,0
b 2. uuton alafaasi	5,25	1,84	10,47	4,59	26,12	2,49	83,9
20 mM puskurointi							
a 1. uuton yläfaasi	5	3,13	15,65	2,77	13,84	0,88	44,5
a 1. uuton alafaasi	5			12,08	60,41		194,1
a 2. uuton yläfaasi	4,5			-0,01	-0,03		-0,1
a 2. uuton alafaasi	3,75	1,94	8,08	3,99	16,62	2,06	53,4
b 1. uuton yläfaasi	5	3,00	15,01	2,55	12,77	0,85	41,0
b 1. uuton alafaasi	5			9,15	45,77		147,1
b 2. uuton yläfaasi	4,5			-0,01	-0,03		-0,1
b 2. uuton alafaasi	3,75	2,17	9,02	1,65	6,89	0,76	22,2
40 mM puskurointi							
a 1. uuton yläfaasi	5,75	3,27	18,79	1,81	10,43	0,56	33,5
a 1. uuton alafaasi	4,25			7,83	33,27		106,9
a 2. uuton yläfaasi	4,75			-0,01	-0,03		-0,1
a 2. uuton alafaasi	3	2,15	7,32	1,05	3,58	0,49	11,5
b 1. uuton yläfaasi	6,25	3,16	19,74	2,07	12,94	0,66	41,6
b 1. uuton alafaasi	3,75			13,42	50,34		161,8
b 2. uuton yläfaasi	4,75			-0,01	-0,03		-0,1
b 2. uuton alafaasi	2,5	1,95	5,63	7,35	21,20	3,76	68,1

Triton-uutot

Berol-uutot

	Tilavuus ml	Proteiinipitoisuus mg/ml	Tot. proteiini mg	Aktiivisuus U/ml	Tot. aktiivisuus U	Spesifinen aktiivisuus U/mg	Saanto %
alkunäyte	1	41,80	41,80	28,11	28,11	0,67	100
0 mM puskurointi							
a 1. uuton yläfaasi	2			8,25	16,49		58,7
a 1. uuton alafaasi	8	2,79	22,36	6,03	48,25	2,16	171,7
a 2. uuton yläfaasi	2,4			0,00	0,01		0,0
a 2. uuton alafaasi	0,6	2,26	2,71	5,83	7,00	2,58	24,9
b 1. uuton yläfaasi	2			7,29	14,58		51,9
b 1. uuton alafaasi	8	2,87	22,94	5,56	44,50	1,94	158,3
b 2. uuton yläfaasi	2,4			0,00	0,01		0,0
b 2. uuton alafaasi	0,6	2,07	2,48	5,64	6,77	2,73	24,1
10 mM puskurointi							
a 1. uuton yläfaasi	2,25			4,62	10,39		37,0
a 1. uuton alafaasi	7,75	3,18	24,66	4,41	34,16	1,39	121,5
a 2. uuton yläfaasi	4,9			0,00	0,02		0,1
a 2. uuton alafaasi	1,1	2,52	3,12	6,38	7,89	2,53	28,1
b 1. uuton yläfaasi	2,25			7,28	16,38		58,3
b 1. uuton alafaasi	7,75	3,04	23,60	3,95	30,62	1,30	109,0
b 2. uuton yläfaasi	4,9			0,01	0,02		0,1
b 2. uuton alafaasi	1,1	2,73	3,37	6,28	7,77	2,30	27,7
20 mM puskurointi							
a 1. uuton yläfaasi	2,1			7,32	15,37		54,7
a 1. uuton alafaasi	7,9	2,98	23,58	3,03	23,92	1,01	85,1
a 2. uuton yläfaasi	4,8			0,00	0,02		0,1
a 2. uuton alafaasi	0,9	2,52	2,58	7,34	7,49	2,91	26,7
b 1. uuton yläfaasi	2,1			7,63	16,03		57,0
b 1. uuton alafaasi	7,9	3,13	24,71	3,57	28,18	1,14	100,3
b 2. uuton yläfaasi	4,9			0,00	0,02		0,1
b 2. uuton alafaasi	0,8	2,98	2,71	7,99	7,26	2,68	25,8
40 mM puskurointi							
a 1. uuton yläfaasi	2			9,44	18,88		67,2
a 1. uuton alafaasi	8	3,08	24,66	3,71	29,70	1,20	105,7
a 2. uuton yläfaasi	4,8			0,00	0,02		0,1
a 2. uuton alafaasi	0,8	2,92	2,67	0,58	0,53	0,20	1,9
b 1. uuton yläfaasi	2			8,14	16,28		57,9
b 1. uuton alafaasi	8	3,21	25,69	3,25	26,01	1,01	92,5
b 2. uuton yläfaasi	4,8			0,01	0,03		0,1
b 2. uuton alafaasi	0,8	2,91	2,66	0,51	0,47	0,18	1,7

	Tilavuus ml	Proteiinipit. mg/ml	Tot. proteiini mg	Aktiivisuus U/ml	Tot. aktiivisuus U	Spesifinen aktiivisuus U/mg	Saanto %
alkunäyte	0,5	22,80	11,40	223,59	111,79	9,81	100
400 mM NaCl +Berol 266							
a 1. uuton yläfaasi	2,25			49,10	110,47		98,8
b 1. uuton yläfaasi	2,25			44,86	100,93		90,3
a 1. uuton alafaasi	7,75	1,18	9,17	22,21	172,11	18,76	154,0
b 1. uuton alafaasi	7,75	1,22	9,46	21,48	166,44	17,59	148,9
a 2. uuton yläfaasi	2			0,04	0,09		0,1
b 2. uuton yläfaasi	8			0,04	0,34		0,3
a 2. uuton alafaasi	1,53	0,83	1,27	35,16	53,80	42,33	48,1
b 2. uuton alafaasi	1,53	1,04	1,58	6,96	10,65	6,73	9,5
200 mM NaCl +Berol 266							
a 1. uuton yläfaasi	2,75			26,93	74,07		66,3
b 1. uuton yläfaasi	2,75			33,55	92,26		82,5
a 1. uuton alafaasi	7,25	1,31	9,47	25,53	185,10	19,55	165,6
b 1. uuton alafaasi	7,25	1,40	10,13	27,42	198,80	19,62	177,8
a 2. uuton yläfaasi	4,5			0,04	0,19		0,2
b 2. uuton yläfaasi	4,5			0,04	0,20		0,2
a 2. uuton alafaasi	2,07	0,61	1,27	7,97	16,48	12,98	14,7
b 2. uuton alafaasi	2,07	0,78	1,61	24,16	49,96	31,12	44,7

	Tilavuus ml	Proteiinipit. mg/ml	Tot. proteiini mg	Aktiivisuus U/ml	Tot. aktiivisuus U	Spesifinen aktiivisuus U/mg	Saanto %
alkunäyte	0,5	22,80	11,4	223,59	111,79	9,806375695	100
400 mM NaCl +Triton X-114							
a 1. uuton yläfaasi	6,2	1,24	7,66072	15,96	98,94	12,9146302	88,49896
b 1. uuton yläfaasi	6,6	1,40	8,6893	18,67	115,76	13,3219634	103,5475
a 1. uuton alafaasi	3,8			24,22	92,03		82,32573
b 1. uuton alafaasi	3,4			16,35	62,14		55,58852
a 2. uuton yläfaasi	4,75			0,03	0,15		0,130266
b 2. uuton yläfaasi	4,75			0,03	0,15		0,131821
a 2. uuton alafaasi	2,5	0,78	2,203042763	34,19	96,72	43,90243902	86,51635
b 2. uuton alafaasi	2	1,08	2,479482353	40,74	93,47	37,69791121	83,61129
200 mM NaCl +Triton X-114							
a 1. uuton yläfaasi	5	1,56	7,7815	19,40	97,01	12,46703015	86,77866
b 1. uuton yläfaasi	5	1,27	6,345	14,92	74,60	11,75786581	66,73394
a 1. uuton alafaasi	5			20,16	100,82		90,18763
b 1. uuton alafaasi	5			19,07	95,34		85,27872
a 2. uuton yläfaasi	4,7			0,03	0,14		0,12787
b 2. uuton yläfaasi	4,7			0,03	0,14		0,12787
a 2. uuton alafaasi	3,8	0,54	2,2615054	7,42	31,02	13,71593388	27,74659
b 2. uuton alafaasi	3,8	0,53	2,209757	6,93	28,98	13,11439862	25,92266
100 mM NaCl +Triton X-114							
a 1. uuton yläfaasi	3,5	1,32	4,63225	11,81	41,34	8,923922033	36,97723
b 1. uuton yläfaasi	3	1,46	4,3902	12,28	36,85	8,394002859	32,96401
a 1. uuton alafaasi	6,5			38,77	252,01		225,4233
b 1. uuton alafaasi	7			33,84	236,86		211,8787
a 2. uuton yläfaasi	4,5			0,03	0,14		0,127613
b 2. uuton yläfaasi	4,5			0,03	0,14		0,126525
a 2. uuton alafaasi	5,5	0,65	3,849881538	19,11	113,18	29,39799395	101,2399
b 2. uuton alafaasi	6	0,50	3,215378571	6,68	42,92	13,34681343	38,38807

	Tilavuus ml	Proteiinipitoisuus mg/ml	Tot. proteiini mg	Aktiivisuus U/ml	Tot. aktiivisuus U	Spesifinen aktiivisuus U/mg	Saanto %
alkunäyte	0,5	31,74	15,87	200,35	100,18	6,31	100
400 mM NH ₄ Cl Berol							
a 1. uuton yläfaasi	2,25			44,45	100,00		99,8
b 1. uuton yläfaasi	2,25			51,03	114,83		114,6
a 1. uuton alafaasi	7,75	0,93	7,21	31,27	242,34	33,63	241,9
b 1. uuton alafaasi	7,75	0,94	7,32	30,56	236,85	32,35	236,4
a 2. uuton yläfaasi	4,5			0,04	0,19		0,2
b 2. uuton yläfaasi	4,5			0,04	0,19		0,2
a 2. uuton alafaasi	1,5	0,71	1,19	22,45	37,42	31,54	37,4
b 2. uuton alafaasi	1,5	0,73	1,21	24,11	40,18	33,12	40,1
400 mM NH ₄ Cl Triton							
a 1. uuton yläfaasi	5,5			19,31	53,10		53,0
b 1. uuton yläfaasi	5,7			18,84	51,80		51,7
a 1. uuton alafaasi	4,5	0,98	7,14	61,41	445,19	62,39	444,4
b 1. uuton alafaasi	4,3	0,93	6,78	61,71	447,39	66,02	446,6
a 2. uuton yläfaasi	4,75			0,03	0,15		0,1
b 2. uuton yläfaasi	4,75			0,03	0,14		0,1
a 2. uuton alafaasi	3,25	0,77	2,73	21,14	74,93	27,49	74,8
b 2. uuton alafaasi	3	0,67	2,19	19,24	62,79	28,68	62,7
200 mM NH ₄ Cl Triton							
a 1. uuton yläfaasi	3,5	1,16	7,22	26,78	166,02	23,01	165,7
b 1. uuton yläfaasi	4	1,17	7,27	25,90	160,57	22,09	160,3
a 1. uuton alafaasi	6,5			16,68	63,37		63,3
b 1. uuton alafaasi	6			69,78	265,18		264,7
a 2. uuton yläfaasi	3,5			0,03	0,15		0,1
b 2. uuton yläfaasi	3,5			0,03	0,15		0,1
a 2. uuton alafaasi	5,5	0,65	4,07	16,27	102,27	25,13	102,1
b 2. uuton alafaasi	5	0,64	3,59	20,19	113,56	31,60	113,4

	Tilavuus ml	Proteiinipitoisuus mg/ml	Tot. proteiini mg	Aktiivisuus U/ml	Tot. aktiivisuus U	Spesifinen aktiivisuus U/mg	Saanto %
alkunäyte	0,5	30,40	15,20	303,07	151,54	9,97	100
400 mM KCl +Berol 266							
a 1. uuton yläfaasi	2,25			45,04	101,33		66,9
b 1. uuton yläfaasi	2,25			49,95	112,38		74,2
a 1. uuton alafaasi	7,75	1,60	12,41	28,76	222,86	17,96	147,1
b 1. uuton alafaasi	7,75	1,73	13,39	27,48	212,94	15,90	140,5
a 2. uuton yläfaasi	5,75			0,06	0,32		0,2
b 2. uuton yläfaasi	5,75			0,05	0,31		0,2
a 2. uuton alafaasi	1	1,17	1,43	42,56	52,02	36,40	34,3
b 2. uuton alafaasi	1	1,01	1,24	32,17	39,32	31,72	25,9
200 mM KCl +Berol 266							
a 1. uuton yläfaasi	2,5			46,38	115,94		76,5
b 1. uuton yläfaasi	2,5			44,02	110,06		72,6
a 1. uuton alafaasi	7,5	2,01	15,09	33,67	252,50	16,73	166,6
b 1. uuton alafaasi	7,5	1,97	14,77	39,53	296,47	20,07	195,6
a 2. uuton yläfaasi	5,75			0,09	0,53		0,3
b 2. uuton yläfaasi	5,75			0,08	0,49		0,3
a 2. uuton alafaasi	1,25	1,06	1,58	32,65	48,97	30,93	32,3
b 2. uuton alafaasi	1,25	0,96	1,44	25,75	38,63	26,78	25,5

	Tilavuus ml	Proteiinipitoisuus mg/ml	Tot. proteiini mg	Aktiivisuus U/ml	Tot. aktiivisuus U	Spesifinen aktiivisuus U/mg	Saanto %
alkunäyte	0,5	30,40	15,20	303,07	151,54	9,97	100
400 mM KCl + Triton X-114							
a 1. uuton yläfaasi	6,5	1,54	9,57	22,03	136,58	14,27	90,1
b 1. uuton yläfaasi	6,75	1,43	8,89	23,67	146,73	16,51	96,8
a 1. uuton alafaasi	3,5			59,05	224,40		148,1
b 1. uuton alafaasi	3,25			99,44	377,87		249,4
a 2. uuton yläfaasi	5,75			0,07	0,32		0,2
b 2. uuton yläfaasi	5,75			0,07	0,31		0,2
a 2. uuton alafaasi	2	1,10	2,36	28,37	61,11	25,90	40,3
b 2. uuton alafaasi	1,8	1,12	2,17	37,01	71,56	32,96	47,2
200 mM KCl +Triton X-114							
a 1. uuton yläfaasi	4,5	1,76	8,80	28,34	141,70	16,11	93,5
b 1. uuton yläfaasi	5,2	1,55	7,74	26,46	132,32	17,09	87,3
a 1. uuton alafaasi	5,5			58,46	292,29		192,9
b 1. uuton alafaasi	4,8			61,08	305,39		201,5
a 2. uuton yläfaasi	5,75			0,05	0,24		0,2
b 2. uuton yläfaasi	5,75			0,08	0,38		0,2
a 2. uuton alafaasi	4	1,02	4,51	22,26	98,95	21,93	65,3
b 2. uuton alafaasi	3,2	1,00	3,50	24,45	85,78	24,54	56,6
100 mM KCl +Triton X-114							
a 1. uuton yläfaasi	1	1,92	1,92	23,96	23,96	12,48	15,8
b 1. uuton yläfaasi	1	1,77	1,77	26,11	26,11	14,74	17,2
a 1. uuton alafaasi	9			33,13	298,18		196,8
b 1. uuton alafaasi	9			37,95	341,57		225,4
a 2. uuton yläfaasi	5			0,05	0,24		0,2
b 2. uuton yläfaasi	5,25			0,05	0,25		0,2
a 2. uuton alafaasi	7,5	0,71	5,60	14,04	111,13	19,85	73,3
b 2. uuton alafaasi	7,75	0,77	6,28	15,82	129,45	20,62	85,4